

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA
Departamento de Sanidad Animal



TESIS DOCTORAL

**Tipificación molecular de *Mannheimia haemolytica* y
Pasteurella multocida asociadas a la pasteurelisis neumónica
ovina**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Andrés García Álvarez

Directora

María Dolores Cid Vázquez

Madrid
Ed. electrónica 2019

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL



**TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE
Mannheimia haemolytica Y *Pasteurella
multocida* ASOCIADAS A LA
PASTEURELOSIS NEUMÓNICA OVINA**

TESIS DOCTORAL

Andrés García Álvarez

Bajo la dirección de la doctora

María Dolores Cid Vázquez

Madrid, 2018



Dña. **María Dolores Cid Vázquez**, Profesora Titular del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid

CERTIFICA:

Que D. Andrés García Álvarez, Licenciado en Veterinaria, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado **"TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE *Mannheimia haemolytica* Y *Pasteurella multocida* ASOCIADAS A LA PASTEURELOSIS NEUMÓNICA OVINA"**, que reúne los requisitos necesarios para ser presentado como tesis doctoral.

En Madrid, a 7 de mayo de 2018

A mis padres, a mi hermano y a Marta

*Que no quiero yo Ser tanto.
Quiero vivir en mi tierra
agrietada de manantiales cristalinos,
andar un poco más lejos que las fronteras
por la sublime añoranza del regreso.
Que no quiero yo Ser tanto.
Quiero Ser un poco de Sol y un poco de noche,
quiero Ser viento y calma,
tormenta, lluvia y olor de tierra mojada.*

Manolo Chinato
Amor, rebeldía, libertad y sangre

*La vida es algo que hay que morder
y en cada boca tiene un sabor.
Mis huesos no los tapa la piel.
Por eso siempre digo que no,
perdona tengo cosas que hacer.
Que aún me queda media vida
pa encontrar la melodía...*

Adolfo Cabrales
Acabo de llegar

*Ordenando mis recuerdos
he pensao que todo fue
hace mucho tiempo ya.
Cada mañana en el espejo
le saludo siempre al viejo
que llegó cuando se fue el chaval.
Casi como un accidente
me envolvió el sonido.
Hay canciones que te dan de frente
y te señalan el camino.*

Adolfo Cabrales
Garabatos

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría poder expresar mi más sincero agradecimiento a las personas que con su ayuda han colaborado en la realización de esta tesis doctoral, haciendo posible que este proyecto deje de ser un sueño loco, para ser una realidad.

En primer lugar, a mi directora de Tesis, la Dra. María Dolores Cid Vázquez, por haber sido mi guía todos estos años. Agradecerle en primer lugar su paciencia, ya que estos años han sido duros por muchos motivos, pero gracias a su orientación, motivación y apoyo hemos salido adelante y hemos disfrutado realizando esta Tesis. Agradecerle también que me diera esta oportunidad casi sin conocerme, y convertirse, además de en mi directora de Tesis, en maestra y amiga. ¡Al final lo hemos conseguido!

Me gustaría agradecer la financiación de esta investigación al Banco Santander y la Universidad Complutense de Madrid (UCM) por el proyecto PR34/07-15910, y al Ministerio de Ciencia e Innovación de España (MICINN) por el proyecto AGL2009-10136.

A todos los profesores del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la UCM. Con todos he tenido una excelente relación, pero me gustaría agradecer especialmente a la Dra. Ana Isabel Vela y al Dr. José Francisco Fernández-Garayzábal, por su colaboración en este proyecto.

Mis más sinceros agradecimientos para todos los demás miembros del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria: personal administrativo, técnicos, doctorandos, posdocs, alumnos internos... Gracias por acogerme como a uno más desde el principio.

Quiero expresar un agradecimiento especial a la Dra. Carmen Martín Espada. De no ser por su llamada una tarde de primavera, todo esto no habría comenzado. Gracias por confiar en mí una vez más.

Especial reconocimiento merece el interés por mi trabajo mostrado por la Dra. Teresa Gómez Muñoz, más que profesora, amiga, con la que me encuentro en deuda por el apoyo y el ánimo brindados. Para ella va también mi más sincero agradecimiento.

No quiero olvidar tampoco al Dr. Joaquín Goyache Goñi, a quien guardo especial cariño, ya que con él descubrí lo apasionante y divertido que puede ser el trabajo de laboratorio en aquellas ya lejanas prácticas de microbiología.

Quisiera hacer extensiva mi gratitud al Dr. Alejandro Brun Torres, por darme la oportunidad de poder dar mis primeros pasos profesionales en el mundo de la Biología Molecular que después se convertirían en la base fundamental de las técnicas de trabajo a usar en el futuro.

Quería agradecer su acogida, ánimo y apoyo este último año a las doctoras Almudena Rebolé, Susana Velasco e Isabel Cervantes y a los doctores Luis Ortiz, Ignacio Arija, Jesús de la Fuente y Juan Pablo Gutiérrez, gracias por hacer que me sienta como en casa.

Agradecer también el apoyo y ayuda, incluso la de último minuto, de Mar y de Carmen, las “Chicas de la Biblio”, sin ellas este trabajo habría sido un poquito más arduo, y desde luego, no habría quedado igual de bonito. Gracias por la ayuda y consejos todos estos años.

A la Dra. Ángeles Jiménez Martínez, que siempre está ahí, desde el principio. Gracias por ser mi amiga y estar siempre a mi lado. Sin su apoyo hoy no estaría donde estoy y no sería lo que soy.

A mis amigos de toda la vida que han sabido disculpar mis idas y venidas. Aunque no los nombre a todos, ellos saben quiénes son y lo importantes que son para mí. Pero sí quiero mandar un agradecimiento especial a Néstor y María, gracias porque, de una manera o de otra siempre habéis sabido lo importantes que sois para mí.

La parte más entrañable de mis agradecimientos es para mi familia, los que están y los que se fueron, todos han puesto su granito de arena para que hoy sea quién y cómo soy. “We must be over the Rainbow” ...

A mi hermano José Carlos y a Lorena, agradecerles el regalo más hermoso que podían hacerme, la pequeña Clara.

A mis padres, Andrés y Antonia, por darme siempre todo, incluso más allá de sus posibilidades. Apoyo, cariño, comprensión y educación. Creyeron en mí y me sacaron adelante, dándome ejemplos dignos de superación y entrega. Este trabajo es más mérito suyo que mío.

A Marta, mi querida, hermosa, mi vida, mi esposa. Siempre a mi lado de manera incondicional, en los malos momentos (algunos muy duros), pero sobre todo en los buenos (muchos más), animándome siempre a continuar. Le doy las gracias por hacerme sentir cada día que podía hacerlo, por su apoyo y sobre todo por hacerme feliz. Por todo eso y más este trabajo también es suyo.

Por último, mi más sincero agradecimiento a todos los animales de experimentación que dan su vida de forma altruista por la ciencia, sin ellos la ciencia no estaría donde está. Aunque no hayan formado parte expresa de esta Tesis, mi vida profesional siempre ha estado ligada a ellos y sin ellos no habría sido posible su realización.

Y no quiero olvidarme de agradecer a Rosendo Mercado, Freddie Mercury y Brian May, Carlos Tarque y Carlos Ruipérez, Bruce Dickinson y Steve Harris, Pacho Brea y Cecilio Sánchez, José Andrea, Kutxi Romero, Jon Bon Jovi y Ritchie Sambora, Brian Johnson y Angus Young, Ramin Djawadi, Howard Shore, Nobuo Uematsu, Silvio Rodríguez, Luis Eduardo Aute y a tantos otros que amenizaron las tardes de duro trabajo. Pero sobre todos ellos destacan Fito Cabrales e Iñaki Antón, Steven Tyler y Joe Perry y el gran maestro John Williams, ellos son la auténtica banda sonora de mi vida...

ÍNDICES

ÍNDICE

ÍNDICE	iii
ÍNDICE DE TABLAS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	ix
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xvii
1. INTRODUCCIÓN	1
PASTEURELOSIS NEUMÓNICA OVINA	3
ETIOLOGÍA	4
EPIDEMIOLOGÍA	5
PATOGENIA	6
SIGNOS CLÍNICOS	8
LESIONES	9
DIAGNOSTICO	9
TRATAMIENTO	10
CONTROL	11
<i>Mannheimia haemolytica</i>	14
CARACTERÍSTICAS, TAXONOMÍA Y FILOGENIA	14
SEROTIPOS	15
FACTORES DE VIRULENCIA	16
<i>Pasteurella multocida</i>	18
CARACTERÍSTICAS, TAXONOMÍA Y FILOGENIA	19
EPIDEMIOLOGÍA	20
TIPOS CAPSULARES, SEROTIPOS Y BIOTIPOS	21
FACTORES DE VIRULENCIA	21
EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR	23
MÉTODOS DE TIPIFICACIÓN MOLECULAR	25
“MULTILOCUS SEQUENCE TYPING” (MLST)	25
ELECTROFORESIS DE CAMPO PULSADO (PFGE)	29

2.	JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	31
3.	MATERIAL Y MÉTODOS	35
	TIPIFICACIÓN DE <i>Mannheimia haemolytica</i>	37
	AISLADOS DE <i>M. haemolytica</i> UTILIZADOS EN ESTE ESTUDIO	37
	“MULTILOCUS SEQUENCE TYPING” (MLST) DE <i>M. haemolytica</i>	38
	ELECTROFORESIS EN GEL DE CAMPO PULSADO (PFGE)	40
	PERFILES DE VIRULENCIA	41
	TIPIFICACIÓN DE <i>Pasteurella multocida</i>	42
	AISLADOS DE <i>P. multocida</i> UTILIZADOS EN ESTE ESTUDIO	42
	DETECCIÓN DE GENES ASOCIADOS A LA VIRULENCIA DE <i>P. multocida</i>	43
	DETECCIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE LA TOXINA PMT	45
	“MULTILOCUS SEQUENCE TYPING” (MLST) MULTI-HOST DE <i>P. multocida</i>	46
	“MULTILOCUS SEQUENCE TYPING” (MLST) RIRDC DE <i>P. multocida</i>	48
	ANÁLISIS DE DATOS	50
4.	RESULTADOS	51
	RESULTADOS DE LA TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE <i>M. haemolytica</i>	53
	FRECUENCIA DE STs POR EL ESQUEMA MLST DE <i>M. haemolytica</i>	53
	PATRONES DE RESTRICCIÓN MEDIANTE PFGE (PULSOTIPOS)	58
	PERFILES DE VIRULENCIA	60
	RESULTADOS DE LA TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE <i>P. multocida</i>	63
	FRECUENCIA DE STs POR EL SISTEMA MLST MULTI-HOST	63
	COMPARACIÓN CON STs DE OTRAS ESPECIES	67
	STs SEGÚN MLST RIRDC DE <i>P. multocida</i>	67
	TIPO CAPSULAR, PERFILES DE VIRULENCIA Y RELACIÓN CON STs (MULTI-HOST)	67
	PRODUCCIÓN DE LA TOXINA DE <i>P. multocida</i> (PMT)	70
5.	DISCUSIÓN	73
	<i>Mannheimia haemolytica</i>	76
	<i>Pasteurella multocida</i>	78
	PERSPECTIVAS DE FUTURO	82
6.	CONCLUSIONES	85
	REFERENCIAS	89

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Enfermedades causadas por *M. haemolytica* y *P. multocida* en animales de producción.

Tabla 1.2. Genes del esquema MLST de *M. haemolytica*.

Tabla 1.3. Genes del esquema MLST Multi-host de *P. multocida*.

Tabla 1.4. Genes del esquema MLST RIRDC de *P. multocida*.

Tabla 3.1. Origen y características de los aislados de *M. haemolytica*

Tabla 3.2. Cebadores utilizados para la amplificación y secuenciación de los genes “housekeeping” en la técnica MLST de *M. haemolytica*

Tabla 3.3. Origen y características de los 43 aislados de *P. multocida*.

Tabla 3.4. Cebadores utilizados en la determinación del tipo capsular y los factores de virulencia de los aislados de *P. multocida*.

Tabla 3.5. Cebadores utilizados para la amplificación y secuenciación de los genes “housekeeping” en el esquema de MLST Multi-host de *P. multocida*.

Tabla 3.6. Cebadores utilizados para la amplificación y secuenciación de los genes “housekeeping” en el esquema de MLST RIRDC de *P. multocida*.

Tabla 4.1. Frecuencias de ST entre aislados de *M. haemolytica* procedentes de pulmones con lesiones neumónicas y sin lesiones neumónicas.

Tabla 4.2. Principales perfiles de genes asociados a virulencia (VPs) de los aislados de *M. haemolytica* examinados en el presente estudio.

Tabla 4.3. Número de aislados correspondientes a cada ST relacionados con los perfiles de virulencia.

Tabla 4.4. Distribución de STs identificados mediante el esquema MLST RIRDC de *P. multocida*.

Tabla 4.5. Distribución del tipo capsular, STs (Multi-host) y perfiles de genes asociados a la virulencia con respecto a la presencia enfermedad en aislados de *P. multocida*.

Tabla 4.6. Detección de toxina PMT mediante Kit PMT de Dako™ en aislados positivos por PCR al gen *toxA* y ST de los aislados analizados por MLST.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 4.1. Frecuencias de ST entre aislados de *M. haemolytica* procedentes de pulmones con lesiones neumónicas y sin lesiones.

Figura 4.2. Análisis e-BURST de los STs de la base de datos de MLST de *M. haemolytica*.

Figura 4.3. Árbol filogenético basado en el método *neighbor-joining* de secuencias concatenadas de ST incluidas en la base de datos MLST de *M. haemolytica*.

Figura 4.4. Dendograma mostrando las relaciones genéticas entre los pulsotipos de *M. haemolytica* identificados por PFGE.

Figura 4.5. Frecuencia de STs en los aislados por el sistema MLST Multi-host de *P. multocida*.

Figura 4.6. Análisis e-BURST de los STs de la bases de datos de MLST Multi-host de *P. multocida*.

Figura 4.7. Árbol filogenético basado en el método *neighbor-joining* de secuencias concatenadas de ST incluidas en la base de datos MLST Multi-host de *P. multocida*.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

bp: Pares de Bases (*Base Pairs*).

CC: Complejos Clonales.

CDC: Centro para el Control de Enfermedades.

CP: Polisacárido Capsular.

DG: Diversidad Genética.

ELISA: Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (*Enzyme –linked immunosorbent assay*).

EUROSTAT: Oficina Estadística de las Comunidades Europeas (*Statistical Office of the European Communities*).

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.

Gg: Grupo Genético.

IC: Intervalo de Confianza.

IRPs: Proteínas de Regulación y Adquisición del Hierro.

LKT: Leucotoxinas.

LPS: Lipolisacárido.

MLEE: Análisis de Isoenzimas Multilocus (*Multilocus Enzyme Electrophoresis*).

MLST: Tipificación de Secuencias Multilocus (*Multilocus Sequence Typing*).

OMPs: Proteínas Externas de Membrana.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

OR: Odds Ratio.

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*).

PFGE: Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (*Pulse Field Gel Electrophoresis*).

PMT: Toxina de *Pasteurella multocida* (*P. multocida Toxin*).

RIRDC: Rural Industries Research and Development Corporation.

ST: Tipo de Secuencia.

VAG: Genes Asociados a la Virulencia (*Virulence-Associated Genes*).

VP: Perfil de Virulencia (*Virulence Profile*).

RESUMEN

La pasteurelosis neumónica es una de las enfermedades que tiene mayor impacto económico en la producción del ganado ovino en todo el mundo y una de las más importantes enfermedades en la etapa neonatal. *M. haemolytica* y *P. multocida* son los principales agentes bacterianos asociados a estos procesos en los pequeños rumiantes. El objetivo principal de este estudio fue la caracterización genética de los aislados de *M. haemolytica* y *P. multocida* asociados a las lesiones neumónicas características de la pasteurelosis neumónica en ovino con la finalidad de contribuir a la mejora del diagnóstico y del diseño de vacunas para la prevención de estos procesos en ovino. Para ello se utilizaron técnicas de tipificación molecular como el “multilocus sequence typing” (MLST), electroforesis de campo pulsado (PFGE) y los perfiles de virulencia (“*virulotyping*”).

En los 121 aislados de *M. haemolytica* analizados se detectaron un total de 12 STs mediante MLST. Los STs más frecuentes fueron ST16 (50/121; 41,3%), ST 28 (29/121; 24,0%) y ST8 (19/121; 15,7%). Las diferencias en las frecuencias y distribución de ST entre aislados de pulmones con y sin lesiones neumónicas no fueron estadísticamente significativas ($P > 0.05$). Estos tres STs representan el 27% de los aislados de oveja, el ST16 y ST8 representan casi un tercio de los aislados de cabra incluidos en la base de datos MLST de *M. haemolytica* lo que indica una amplia distribución de estos genotipos en pequeños rumiantes. Además, esto unido a que estos STs no se han identificado en aislados bovinos sugiere la adaptación de ciertos linajes genéticas de *M. haemolytica* a pequeños rumiantes.

Mediante análisis e-BURST, el 54,5% de los aislados de *M. haemolytica* se agruparon en tres complejos clonales: CC28 (31 aislados, 25,6%), CC8 (29 aislados, 24,0%) y el CC4 (6 aislados, 5,0%). Además, el 41,0% de los aislados (50/121) pertenecieron al *singleton* ST16. La estructura poblacional observada mediante e-BURST se mantuvo al realizar un análisis mediante neighbor-joining a partir de las secuencias concatenadas de los siete *loci* del esquema MLST donde la mayoría de los aislados se agruparon en dos grupos genéticos (Gg1 y Gg2). Los 69 aislados procedentes de pulmones con lesiones neumónicas generaron 48 perfiles PFGE, y los 41 aislados procedentes de pulmones sin lesiones neumónicas generaron 27 perfiles PFGE, lo que implica una DG de 0,69 y 0,66, respectivamente ($P > 0,05$). En cuanto al análisis de los perfiles de virulencia, cinco perfiles de virulencia incluyeron el 64% y el

65,2% de los aislados de *M. haemolytica* de pulmones con y sin lesiones neumónicas, respectivamente. No se detectaron diferencias significativas entre los perfiles de virulencia de los aislados procedentes de lesiones neumónicas y los procedentes de pulmones sin lesiones, excepto el perfil 1 que fue significativamente más frecuente en los aislados no neumónicos. Estos resultados indican que las poblaciones de *M. haemolytica* procedentes de lesiones neumónicas y de pulmones sin lesiones son poblaciones genéticamente homogéneas. La similitud genética de estas poblaciones y el grado de diversidad genética indican que son múltiples las cepas que pueden producir la lesión en los corderos y confirmarían la hipótesis generalmente aceptada de que los casos individuales de neumonía en los ovinos se deben a cepas de *M. haemolytica* comensales del tracto respiratorio superior que descienden al pulmón debido a la actuación de factores estresantes que alteran las defensas del hospedador.

En los 43 aislados de *P. multocida* analizados se detectaron 16 STs por el esquema MLST Multi-host, la mayoría de ellos (13/16) detectados por primera vez en *P. multocida*. Los ST hallados con mayor frecuencia fueron el ST50 (12/43; 27,9%) y el ST19 (11/43; 25,6%), que engloban el 53,5% de los aislados. En el análisis filogenético mediante el método *neighbor-joining* de las secuencias concatenadas de los 7 genes de los STs de la base de datos, al igual que en el análisis e-BURST, se detectaron dos grupos genéticos, el GgOv1 que incluyó los aislados del ST19 y GgOv2 que incluyó los del ST50. Estos grupos genéticos incluían exclusivamente STs detectadas en rumiantes, mayoritariamente ovino, según la base de datos pública del MLST Multi-host, lo que sugiere una adaptación específica de estos grupos al ovino. Por el sistema MLST RIRDC de *P. multocida* se detectaron 7 STs diferentes, tres de ellas (ST95_{RIRDC}, ST131_{RIRDC}, ST203_{RIRDC}) detectados previamente solo en neumonía de ovino y un aislado de caprino, y el resto identificadas por primera vez confirmando la posible adaptación de estos genotipos a los pequeños rumiantes. El tipo capsular A se asoció de manera estadísticamente significativa ($P < 0,05$) al ST50 y el tipo capsular D al ST19. En función de la presencia o ausencia de los genes asociados a virulencia analizados en este estudio, los aislados se clasificaron en cinco perfiles de virulencia distintos, siendo el perfil *tbpA*+/*tox*A+ el identificado con mayor frecuencia. La presencia del antígeno de la toxina PMT se detectó en el 93,1 % de los

aislados *toxA* positivos. La presencia del gen *toxA* en combinación con el *tbpA*, específico de rumiantes, y su asociación con el tipo capsular A, indican que estas cepas ovinas son genéticamente distintas de las cepas toxigénicas asociadas a la rinitis atrófica porcina. Además, en este estudio se ha comprobado que aislados de *P. multocida* portadores del gen *toxA* expresan la toxina PMT detectable por ELISA, demostrando la capacidad toxigénica de estas cepas.

ABSTRACT

Pneumonic pasteurellosis is one of the diseases that has the greatest economic impact on sheep production worldwide and one of the most important diseases in the neonates. *M. haemolytica* and *P. multocida* are the main bacterial agents associated with these processes in small ruminants. The main objective of this study was the genetic characterization of the isolates of *M. haemolytica* and *P. multocida* associated with the pneumonic lesions characteristic of the pneumonic pasteurellosis in sheep with the purpose of contributing to the improvement of the diagnosis and vaccine design for the prevention of these conditions in sheep. For this, molecular typing techniques such as "multilocus sequence typing" (MLST), pulsed field electrophoresis (PFGE) and virulence profile typing ("virulotyping") were used. In the 121 isolates of *M. haemolytica* analyzed a total of 12 STs were detected by MLST. The most frequent STs were ST16 (50/121, 41.3%), ST 28 (29/121, 24.0%) and ST8 (19/121, 15.7%). The differences in frequencies and distribution of ST between lung isolates with and without pneumonic lesions were not statistically significant ($P > 0.05$). These three TS represent 27% of the sheep isolates, ST16 and ST8 represent almost a third of the goat isolates included in the MLST database of *M. haemolytica*, which indicates a wide distribution of these genotypes in small ruminants. Furthermore, this, together with the fact that these STs have not been identified in bovine isolates, suggests the adaptation of certain genetic lineages of *M. haemolytica* to small ruminants.

In e-BURST analysis, 54.5% of *M. hemolytica* isolates were grouped into three clonal complexes: CC28 (31 isolates, 25.6%), CC8 (29 isolates, 24.0%) and CC4 (6 isolates, 5.0%). In addition, 41.0% of the isolates (50/121) belonged to the ST16 singleton. The population structure observed by e-BURST was maintained when performing a neighbor-joining analysis from the concatenated sequences of the seven *loci* of the MLST scheme where most of the isolates were grouped into two genetic groups (Gg1 and Gg2). The 69 isolates from lungs with pneumonic lesions generated 48 PFGE profiles and the 41 isolates from lungs without pneumonic lesions generated 27 PFGE profiles, which implies a GD of 0.69 and 0.66, respectively ($P > 0.05$). Regarding the analysis of virulence profiles, five virulence profiles included 64% and 65.2% of *M. haemolytica* isolates of lungs with and without pneumonic lesions, respectively. No significant differences were detected between the virulence profiles

of the isolates from pneumonic lesions and those from lungs without lesions, except profile 1, which was significantly more frequent in non-pneumonic isolates. These results indicate that populations of *M. haemolytica* from pneumonic lesions and lungs without lesions are genetically homogeneous populations. The genetic similarity of these populations and the degree of genetic diversity indicate that there are multiple strains that can cause this disease in lambs and confirm the generally accepted hypothesis that individual cases of pneumonia in sheep are due to strains of *M. haemolytica* commensals of the upper respiratory tract that descend to the lung due to the action of stressors that alter the host's defenses.

In the 43 isolates of *P. multocida* analyzed, 16 STs were detected by the MLST Multi-host scheme, most of them (13/16) detected for the first time in *P. multocida*. The ST most frequently found were ST50 (12/43, 27.9%) and ST19 (11/43, 25.6%), which encompass 53.5% of the isolates. In the phylogenetic analysis by means of the neighbor-joining method of the concatenated sequences of the 7 genes of the STs of the database, as in the e-BURST analysis, two genetic groups were detected, the GgOv1 that included the isolates of the ST19 and GgOv2 that included those of the ST50. These genetic groups included exclusively STs detected in ruminants, mostly sheep, according to the MLST Multi-host public database, which suggests a specific adaptation of these groups to sheep. In the MLST analysis by the RIRDC system of *P. multocida* 7 different STs were detected, three of them (ST95_{RIRDC}, ST131_{RIRDC}, ST203_{RIRDC}) previously detected only in isolates from pneumonia of sheep and a goat, and the rest identified for the first time confirming the possible adaptation of these genotypes to small ruminants. Capsular type A was associated statistically significantly ($P < 0.05$) with ST50 and capsular type D with ST19. Depending on the presence or absence of the genes associated with virulence analyzed in this study, the isolates were classified into five distinct virulence profiles, with the *tbpA*+/*toxA*+ profile being the one most frequently identified. The presence of the PMT toxin antigen was detected in 93.1% of the *toxA* positive isolates. The presence of the *toxA* gene in combination with *tbpA*, specific to ruminants, and its association with capsular type A, indicate that these ovine strains are genetically distinct from the toxigenic strains associated with porcine atrophic rhinitis. In addition, in this study it has been proven that *P. multocida* isolates carrying the *toxA*

gene express the PMT toxin detectable by ELISA, demonstrating the toxigenic capacity of these strains.

1. INTRODUCCIÓN



PASTEURELOSIS NEUMÓNICA OVINA

La pasteurelosis neumónica es una de las infecciones bacterianas más comunes en el ganado ovino y la enfermedad respiratoria más importante (Donachie, 2007). Se trata de una enfermedad de distribución mundial (Donachie, 2007; Radostits y Done, 2007; Constable *et al.*, 2016), descrita en ovino por primera vez en 1931 (Dungal, 1931). La pasteurelosis neumónica ovina es un proceso bronconeumónico producido por la infección pulmonar por bacterias de la Familia *Pasteurellaceae*, *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida* (Fodor *et al.*, 1999; Highlander, 2001; Angen *et al.*, 2002). Ambas bacterias están presentes como comensales y habitantes normales de la microbiota nasal y faríngea de rumiantes sanos (Dabo *et al.*, 2007; Rice *et al.*, 2007; Boyce *et al.*, 2010; Wilson y Ho, 2013) y ambos organismos se aíslan frecuentemente de la nasofaringe y la tráquea, tanto de animales sanos, como enfermos (Ewers *et al.*, 2004; Dabo *et al.*, 2007; Rice *et al.*, 2007; Taylor *et al.*, 2010a). *M. haemolytica* también está presente en el medio ambiente, en el pasto y el agua y en las camas de los alojamientos, y su supervivencia es prolongada en condiciones de humedad y frío (Radostits y Done, 2007). Estas bacterias pueden descender al pulmón cuando hay un déficit del estado inmunológico del hospedador debido a infecciones concomitantes, presencia de factores estresantes y condiciones ambientales adversas (Martín Espada y Cid Vázquez, 2013). Los brotes se dan en cualquier franja de edad, aunque es más frecuente en corderos jóvenes. Los factores de riesgo que facilitan la aparición de brotes son, principalmente, un manejo estresante para los animales y los cambios bruscos en las condiciones climatológicas que coinciden con final de primavera y de otoño (Radostits y Done, 2007).

La principal característica de este proceso es el desarrollo de lesiones bronconeumónicas producidas por la intensa respuesta inflamatoria, de carácter fibrinosupurativo y necrotizante (Brogden *et al.*, 1998; Ackermann y Brogden, 2000). En los corderos, el brote puede iniciarse en la granja con la aparición de muertes súbitas (Donachie, 2007; Radostits y Done, 2007). Si se desarrolla, la neumonía puede tener un curso agudo con toxemia, fiebre, depresión y anorexia (Brogden *et al.*, 1998; Donachie, 2007; Radostits y Done, 2007). Los corderos que sobreviven pueden recuperarse o

evolucionar a una forma subclínica de curso crónico, reduciéndose la capacidad pulmonar y la ganancia en peso (Brogden *et al.*, 1998), caracterizada por consolidación de los lóbulos apicales y cardíacos del pulmón, en la que predomina el exudado fibrinoso y la pleuritis fibrinosa (Radostits y Done, 2007).

Estos procesos respiratorios, que afectan a los corderos hasta el final del cebo, son una de las principales causas de pérdidas económicas en la producción ovina y caprina (Brogden *et al.*, 1998; Donachie, 2007; Radostits y Done, 2007) y es aquí donde radica su importancia. Estas pérdidas son tanto directas, debido a la mortalidad de corderos y los gastos en tratamiento, como indirectas, debidas a la influencia negativa de la enfermedad en la ganancia de peso de los corderos (Goodwin *et al.*, 2004; Lacasta *et al.*, 2008; Pardon *et al.*, 2013), debidas a retrasos en crecimiento, menor Ganancia Media Diaria (GMD), peor Índice de Conversión (IC) o aumento de los decomisos en matadero (Goodwin-Ray *et al.*, 2008b).

ETIOLOGÍA

Los principales agentes etiológicos bacterianos de la pasteurelosis neumónica en rumiantes se consideran *M. haemolytica* y en menor medida *P. multocida* (Donachie, 2007; Quinn *et al.*, 2013; Constable *et al.*, 2016). En la presentación de pasteurelosis neumónica en ganado ovino intervienen además otros agentes que facilitan la aparición de neumonía en la especie ovina, tanto bacterias (*Histophilus somni* y *Mycoplasma spp.*), como virus (Parainfluenza-3, Adenovirus o Virus Respiratorio Sincitial) (Fulton *et al.*, 1982; Martin, 1982; Brako *et al.*, 1984; Lehmkuhl *et al.*, 1985; Brogden *et al.*, 1998).

La etiología de la pasteurelosis neumónica en ovino está asociada a la unión de varios factores que interaccionan para causar la enfermedad: factores propios del hospedador (inmunológicos, fisiológicos, etc.), la presencia de los agentes infecciosos ya mencionados, y la concurrencia de factores ambientales y de manejo (Brogden *et al.*, 1998). Entre los factores ambientales predisponentes, generalmente denominados como factores de estrés, pueden citarse los siguientes: transporte inadecuado de animales, formación de lotes de animales procedentes de diferentes fuentes, tipo de estabulación de los animales (hacinamiento), ventilación insuficiente o ineficaz, cambios

extremos de temperatura, mal manejo en el destete (Donachie, 2007; Radostits y Done, 2007; Taylor *et al.*, 2010b).

EPIDEMIOLOGÍA

La mayoría de los brotes de pasteurelosis neumónica en Europa afectan tanto a ovejas como a corderos. Los brotes suelen comenzar con muertes súbitas, a menudo en corderos jóvenes en los que la enfermedad puede tener una presentación septicémica e hiperaguda. En animales mayores, la enfermedad afecta más a la cavidad torácica, apareciendo lesiones neumónicas y pericarditis. A medida que el brote progresa, aparecerán más ovejas con signos clínicos de neumonía, tos ocasional y descarga óculo-nasal leve (Donachie, 2007). La pasteurelosis neumónica también se puede presentar de forma esporádica y no como brote (Donachie, 2007). Además, la pasteurelosis neumónica puede afectar tanto a rumiantes domésticos como silvestres (Ackermann y Brogden, 2000; Villard *et al.*, 2006; Rice *et al.*, 2007; George *et al.*, 2008; Dassanayake *et al.*, 2009; Lawrence *et al.*, 2010; Besser *et al.*, 2013; Posautz *et al.*, 2014).

La transmisión de la enfermedad en las explotaciones de rumiantes, tanto en bovino como en ovino no está muy clara actualmente. Los brotes de pasteurelosis pueden deberse a factores predisponentes que permiten a las bacterias comensales superar el sistema inmunitario del hospedador y colonizar el pulmón, al contagio y diseminación de un clon virulento, o a una mezcla de ambos mecanismos (Rice *et al.*, 2007; Taylor *et al.*, 2010b; c).

La morbilidad de la pasteurelosis neumónica suele ser alta en los corderos y la mortalidad variable. En nuestro país, las evidencias clínicas y de matadero indican que la neumonía de los corderos es un proceso ampliamente difundido en las explotaciones ovinas (Martín Espada y Cid Vázquez, 2013). Los corderos de entre 5 y 12 meses y las ovejas en lactación son más susceptibles de enfermar de pasteurelosis neumónica (Smith, 1960), en cambio los corderos menores de 2 meses son altamente susceptibles y la infección evoluciona rápidamente a una septicemia mucho más severa que puede llegar a provocar muertes súbitas sin signos clínicos previos (Radostits y Done, 2007).

Los brotes de pasteurelosis neumónica suelen aparecer después de la exposición de los animales a otros agentes infecciosos, factores de manejo deficientes (principalmente los factores estresantes que tienen un efecto inmunosupresor), y las condiciones medio ambientales adversas (Brogden et al., 1998; Donachie, 2007; Radostits y Done, 2007).

En ovino existen pocos estudios sobre los factores de riesgo que intervienen en la aparición de brotes de pasteurelosis neumónica, pero existen evidencias de la influencia de determinados factores climáticos y de manejo en la presentación de la enfermedad, especialmente los que provocan un compromiso en el sistema inmunitario de los animales (Martín Espada y Cid Vázquez, 2013).

Al igual que en ganado bovino (Taylor *et al.*, 2010b), los brotes suelen aparecer después de la exposición de los animales a estos factores de riesgo. En animales en extensivo los brotes se asocian con cambios bruscos en temperatura y humedad (como los correspondientes a finales de primavera, principios de verano, y a principios de otoño), o manejo (esquileo, corte de pezuñas, época de cría, cambios en la alimentación, época de destete) (Radostits y Done, 2007). En animales en régimen de estabulación, los brotes se asocian a cambios bruscos en el manejo (esquileo, cambios en la alimentación, mezcla de animales de diferente procedencia, entrada de animales nuevos, transporte) y malas condiciones de los alojamientos (Radostits y Done, 2007).

La concurrencia de otros agentes infecciosos como virus (PI3V, Adenovirus), bacterias (*Histophilus somni* y *Mycoplasma spp*) o parasitosis severas que comprometen el sistema inmunitario del hospedador, también aumentan el riesgo de aparición de pasteurelosis neumónica (Radostits y Done, 2007; Galapero *et al.*, 2016).

PATOGENIA

El desarrollo de pasteurelosis neumónica en ovinos y caprinos es en general el mismo que en la pasteurelosis neumónica de bovinos (Radostits y Done, 2007), siendo *M. haemolytica* el patógeno principal en la pasteurelosis neumónica. *M. haemolytica* es comensal del tracto respiratorio superior de los rumiantes, colonizando la nasofaringe y las tonsilas de los corderos poco después del nacimiento, principalmente procedente de

la madre, pero también del medio ambiente, quedando los animales portadores durante toda su vida adulta (Radostits y Done, 2007). *M. haemolytica* también está presente en la hierba y en el agua en áreas de pastoreo y en la cama de los corrales, además, la supervivencia del agente en el medio se prolonga en condiciones de frío y humedad (Radostits y Done, 2007).

M. haemolytica puede actuar como patógeno primario en los corderos más jóvenes, pero suele actuar como patógeno secundario a otros factores predisponentes en los animales mayores (Martín Espada y Cid Vázquez, 2013). *M. haemolytica* desciende al pulmón cuando las defensas del hospedador se ven comprometidas por infecciones concurrentes con virus respiratorios, por la exposición a factores estresantes o por condiciones climáticas adversas (Radostits y Done, 2007; Martín Espada y Cid Vázquez, 2013).

Los animales sanos son capaces de controlar la multiplicación de las bacterias en la nasofaringe, y las bacterias inhaladas en aerosoles, son eliminadas del pulmón por el sistema inmune sin que lleguen a colonizarlo (Singh *et al.*, 2011; Martín Espada y Cid Vázquez, 2013). En los animales sometidos a los factores predisponentes ya mencionados, las bacterias se multiplican intensamente en la nasofaringe y descienden al pulmón en grandes cantidades, sobrepasando las defensas y estableciendo la infección pulmonar (Martín Espada y Cid Vázquez, 2013). La infección pulmonar por *M. haemolytica* desencadena una intensa respuesta inflamatoria mediada por neutrófilos y otras células inflamatorias, como los macrófagos alveolares, las células epiteliales alveolares y bronquiales, el endotelio vascular y los linfocitos. Los neutrófilos liberan factores inflamatorios durante la respuesta inflamatoria aguda y contribuyen al daño del parénquima pulmonar, del epitelio alveolar y provocan apoptosis y necrosis celular (Ackermann y Brogden, 2000).

Además, *M. haemolytica* y *P. multocida* producen factores de virulencia que producen daño en los tejidos aumentando la respuesta inflamatoria. Los principales factores de virulencia de *M. haemolytica* son la leucotoxina, la cápsula y el lipopolisacárido (LPS) (Rice *et al.*, 2007). La respuesta inflamatoria producida por *M. haemolytica* puede iniciarse con bacterias vivas, bacterias muertas, polisacáridos de la

cápsula, el LPS y la leucotoxina. Estos elementos bacterianos son liberados en el exudado intraalveolar durante la infección (Ackermann y Brogden, 2000).

En *P. multocida* también se han descrito numerosos componentes celulares como factores de virulencia o potenciales factores de virulencia (Dabo *et al.*, 2007). Entre ellos figuran la cápsula, factores de adherencia y colonización, proteínas de regulación y adquisición del hierro (IRPs), enzimas extracelulares, lipolisacárido (LPS), polisacáridos de la cápsula y proteínas externas de membrana (OMPs) (Dabo *et al.*, 1997; Dabo *et al.*, 2007).

SIGNOS CLÍNICOS

En cuanto a su presentación, los brotes de pasteurelosis neumónica en las explotaciones ovinas suelen iniciarse con la aparición de muerte súbita de algunos animales y alteraciones agudas de otros (Donachie, 2007; Radostits y Done, 2007).

Algunos corderos desarrollarán pasteurelosis neumónica aguda, que se presenta con fiebre de 40 a 41°C, secreción nasal mucopurulenta bilateral, abdomen deprimido y atonía ruminal, tos, diversos grados de polipnea y disnea, y evidencia de bronconeumonía a la auscultación (Donachie, 2007; Radostits y Done, 2007). En las primeras etapas se pueden escuchar sonidos respiratorios en la auscultación de los lóbulos anterior y ventral de los pulmones. A medida que la enfermedad progresa, estos sonidos respiratorios se hacen más fuertes y se extienden sobre un área mayor. Se pueden escuchar crepitaciones, seguidas de sibilancias a los pocos días, especialmente en casos crónicos. Puede ser audible la fricción de las pleuras, pero la ausencia de fricción no quiere decir que no exista pleuritis adherente extensa. En casos severos o de varios días de duración, la disnea es muy marcada, aunque la frecuencia respiratoria puede no ser elevada. El curso de la enfermedad es de sólo 2 a 4 días. Si se trata temprano, el ganado afectado se recupera en 24 a 48 horas, pero los casos graves y los que no son tratados a tiempo pueden morir o cronificarse, incluso a pesar del tratamiento (Radostits y Done, 2007).

La forma crónica se caracteriza por toses frecuentes, jadeo, secreciones mucopurulentas por nariz e incluso ojos y aparición de caquexia progresiva. Algunos

animales pueden recuperarse espontáneamente sin tratamiento (Donachie, 2007; Radostits y Done, 2007).

LESIONES

La principal característica que define este proceso es el desarrollo de lesiones bronconeumónicas. Macroscópicamente se observa consolidación pulmonar marcada, por lo general en los lóbulos apicales de los pulmones, debido a la respuesta inflamatoria fibrinosupurativa intensa y necrotizante (Ackermann y Brogden, 2000).

La neumonía evoluciona, comenzando con congestión y edema y pasando por varias etapas de consolidación con exudación serofibrinosa en los espacios interlobulares. Suele aparecer bronquitis catarral y bronquiolitis y pleuritis fibrinosa, que pueden estar acompañadas de pericarditis fibrinosa. El pulmón aparece firme y la superficie revela un patrón irregular, resultado de hemorragia, necrosis y consolidación. Las lesiones más características en pasteurelosis neumónica son las típicas de una bronconeumonía: necrosis alveolar difusa, edema en los septos interlobulares y descamación de la mucosa bronquial (Martín Espada y Cid Vázquez, 2013). En casos crónicos quedan lesiones residuales de bronconeumonía con adherencias pleurales superpuestas. En ovino, después de la fase inflamatoria aguda, es típica la presencia de las denominadas células avena ("*oat cells*") en las zonas subyacentes a los alveolos necróticos (Radostits y Done, 2007).

P. multocida provoca una bronconeumonía fibrinopurulenta sin la presencia de necrosis multifocal característica de la neumonía lobular fibrinosa asociada con *M. haemolytica* (Radostits y Done, 2007). Ambas bacterias pueden ser aisladas a partir de muestras tomadas de lesiones pulmonares y exudados (Radostits y Done, 2007).

DIAGNOSTICO

La pasteurelosis neumónica es la causa más común de neumonía aguda en ovejas, pero el diagnóstico basado en los signos clínicos y la historia clínica no es definitivo (Donachie, 2007). El aislamiento de *M. haemolytica* a partir de hisopos nasales no tiene valor diagnóstico puesto que es habitante normal del tracto

respiratorio superior y la serología no es útil ni en medicina individual ni colectiva (Donachie, 2007). El diagnóstico definitivo se realiza por los hallazgos anatomopatológicos y el aislamiento de *M. haemolytica* y/o *P. multocida* de las lesiones pulmonares (Quinn *et al.*, 2013). Estas lesiones bronconeumónicas pulmonares y/o necróticas son características de pasteurelisis neumónica (Donachie, 2007). Se puede confirmar el diagnóstico mediante la evidencia histológica de lesiones que contengan células avena ("oat cells") (Donachie, 2007; Radostits y Done, 2007).

TRATAMIENTO

El tratamiento de la pasteurelisis neumónica es preferentemente antibiótico y se administra frente a *M. haemolytica* y *P. multocida*, aunque es complejo, ya que pueden existir otros agentes etiológicos complicando el proceso (Martín Espada y Cid Vázquez, 2013) y por la existencia de un aumento de las resistencias a antibióticos de la familia *Pasteurellaceae* frente a antibióticos con registro para estas especies animales (Kehrenberg *et al.*, 2001).

La situación ideal es basarse en los resultados del aislamiento bacteriano y la determinación de la sensibilidad antimicrobiana *in vitro*, pero esto supone un retraso en el tratamiento no aconsejable cuando se produce un brote (Martín Espada y Cid Vázquez, 2013). Así, los tratamientos de la pasteurelisis neumónica se basan en la experiencia clínica y en resultados de ensayos clínicos de campo. Aproximadamente del 85% al 90% de los animales afectados se recuperan en 24 horas si se tratan de manera oportuna (Constable *et al.*, 2016).

La elección del antibiótico dependerá del coste, la disponibilidad, la eficacia esperada, la facilidad y frecuencia de administración, las concentraciones que puedan alcanzarse en el órgano diana de los animales afectados, y la duración del período de supresión requerido antes del sacrificio o la duración de la retención de leche en el caso de ganado lechero (Constable *et al.*, 2016). Los tratamientos suelen iniciarse con los antibióticos recomendados para estas especies bacterianas. Se suelen utilizar sulfonamidas, tetraciclinas, estreptomicina y florfenicol (Kehrenberg *et al.*, 2001; Martín Espada y Cid Vázquez, 2013).

En Estados Unidos se han utilizado con éxito para el tratamiento y control de la pasteurelosis neumónica bovina, antibióticos de nueva generación, como los macrólidos tilmicosina, tulatromicina o gamitromicina (Constable *et al.*, 2016). Otros antimicrobianos de uso común con eficacia probada incluyen el florfenicol, un análogo del tiamfenicol y las quinolonas enrofloxacin, difloxacin y danofloxacin. El ceftiofur también resultó ser eficaz para el tratamiento de la pasteurelosis respiratoria bovina en condiciones experimentales (Constable *et al.*, 2016). La oxitetraciclina de acción prolongada ha demostrado ser eficaz terapéutica y profilácticamente en corderos infectados experimentalmente y en condiciones de campo (Aitken, 2008).

En ocasiones, se puede producir un fallo terapéutico, que puede deberse a la iniciación tardía del tratamiento que puede producir complicaciones tales como absceso pulmonar, bronquiectasia y pleuritis; la presencia de neumonía vírica o intersticial o alguna otra neumonía que no responda a los antibióticos; una dosis inadecuada de antibiótico o duración inadecuada del tratamiento; la presencia o desarrollo de resistencias bacterianas al antibiótico empleado (Constable *et al.*, 2016). Además, el tratamiento de la neumonía por *M. haemolytica* debe incluir antiinflamatorios para regular la respuesta inflamatoria aguda, ya que la respuesta inflamatoria que se produce en la infección por *M. haemolytica* es excesiva (Ackermann y Brogden, 2000).

CONTROL

El control de la pasteurelosis neumónica en ganado ovino es complejo debido a su etiología multifactorial y a que las medidas de control, tratamiento antibiótico y vacunación, tienen importantes limitaciones (Martín Espada y Cid Vázquez, 2013). El control de los brotes se base en la vacunación (Aitken, 2008). Sin embargo, la vacunación es solo efectiva parcialmente debido a la multiplicidad de agentes infecciosos, a la variabilidad de los mismos, y a la participación de otros factores en la presentación de la enfermedad (Martín Espada y Cid Vázquez, 2013).

En ovino, las primeras vacunas comerciales contra la pasteurelosis eran bacterinas y contenían un rango muy limitado de serotipos (Donachie, 2007). Ya en 1997, se desarrollaron nuevas vacunas basadas en antígenos proteicos implicados en la captación de hierro (Donachie, 2007). Se observó que las bacterias recogidas de efusión

pleural, es decir, bacterias obtenidas *in vivo* tenían proteínas no presentes en *Mannheimia* cultivadas *in vitro*, y que las ovejas producían una respuesta inmune a esas proteínas. Las *Mannheimia* cultivadas *in vitro* bajo condiciones de limitación de hierro sí fueron capaces de producir proteínas (proteínas reguladas por hierro, IRP) idénticas a las de bacterias obtenidas *in vivo*. Las vacunas hechas a partir estas bacterias eran altamente protectoras (Gilmour *et al.*, 1991), además como estas IRPs son antigénicamente similares en todos los serotipos, las vacunas pueden ofrecer protección cruzada contra serotipos no presentes en la vacuna (Donachie, 1995).

Existen otros antígenos implicados en la inmunidad ante *M. haemolytica*. Los títulos altos de anticuerpos neutralizantes de leucotoxina inducidos por infecciones naturales se asocian con menor susceptibilidad a pasteurelisis neumónica (Constable *et al.*, 2016) ya que los títulos de anticuerpos neutralizantes específicos de leucotoxina y la actuación de complemento son capaces de matar *M. haemolytica in vitro* (Aitken, 2008; Constable *et al.*, 2016).

El aparente fallo o falta de eficacia de las vacunas frente a *M. haemolytica* puede deberse, en algunos casos, a la aparición de pasteurelisis neumónicas causadas por *P. multocida* (Martín Espada y Cid Vázquez, 2013).

En cuanto a *P. multocida*, además de vacunas basadas en bacterinas y extractos celulares, en 1984 (Cameron y Bester, 1984) se diseñó una vacuna eficaz para la inmunización de ovejas contra la infección a partir de la cepa D4 de *P. multocida* (Tipo D) y una cepa seleccionada de *P. multocida* Tipo A. Utilizando una concentración adecuada, esta vacuna fue capaz de inducir la producción de anticuerpos en ovejas, a partir de las que se obtuvo un suero capaz de proteger a ratones no sólo contra las cepas vacunales, sino también contra la infección por cepas heterólogas de Tipo A y de Tipo D, así como cepas no tipificables (Cameron y Bester, 1984).

Otro enfoque para el control es la vacunación de corderos con vacunas frente al virus PI-3, además de la vacunación frente a *M. haemolytica* y *P. multocida*, en un intento de inmunizar a los corderos contra la exposición frente a este virus como a *M. haemolytica* (Radostits y Done, 2007). La vacunación experimental de corderos libres de patógenos específicos con una vacuna PI -3V inactivada proporciona protección contra

el efecto combinado de un desafío experimental con PI-3V y *M. haemolytica* (Davies *et al.*, 1983; Rodger, 1989; Thonney *et al.*, 2008).

Por otra parte, la pasteurelosis neumónica es un proceso complejo en el que intervienen múltiples agentes infecciosos y además otros factores relativos al medio ambiente y al manejo y, por tanto, la estrategia de prevención no puede basarse solo en la vacunación (Rice *et al.*, 2007). El control de la enfermedad debe incluir el control de los factores de riesgo. Es necesario conocer estos factores, especialmente los relacionados con el manejo, implicados en la aparición de estos procesos para actuar sobre ellos (Martín Espada y Cid Vázquez, 2013). A diferencia de bovino, los factores de riesgo de la pasteurelosis neumónica ovina han sido poco estudiados, por tanto, las medidas de control no están bien definidas (Goodwin-Ray *et al.*, 2008a; Galapero *et al.*, 2016). Las condiciones de explotación y manejo del ganado ovino en nuestro país son muy variadas y es necesario estudiar qué prácticas de manejo más habituales en nuestros sistemas de explotación suponen un riesgo de desarrollo de estos procesos respiratorios tan limitantes de la producción (Martín Espada y Cid Vázquez, 2013). En un estudio reciente realizado en la cabaña ovina extremeña se ha indicado la temperatura, la humedad relativa y la infección por *Mycoplasmas* como los principales factores relacionados con la consolidación pulmonar en corderos (Galapero *et al.*, 2016).

El control de las pérdidas económicas producidas por la enfermedad en ganado bovino está más estudiado y pasa por la integración de la gestión y del uso de antibióticos y vacunas. El éxito dependerá de la adopción de técnicas eficaces de manejo (acondicionamiento de los animales, procedimiento de destete adecuado, creación de lotes uniformes, estabulación adecuada, protección frente a cambios bruscos de temperatura, etc.), el uso sensato de antibióticos y vacunas eficaces y el cuidado en el manejo y transporte del ganado (Constable *et al.*, 2016).

Mannheimia haemolytica

M. haemolytica es un patógeno específico de rumiantes, asociado principalmente a enfermedades respiratorias. Es el principal responsable de la pasteurelosis neumónica bovina (Constable *et al.*, 2016) y la pasteurelosis neumónica ovina (Donachie, 2007; Radostits y Done, 2007; Martín Espada y Cid Vázquez, 2013). Es causante, además, de mamitis y septicemia en el ganado ovino (Rice *et al.*, 2007; Boyce *et al.*, 2008) y se ha aislado con frecuencia en el tracto respiratorio superior de ganado vacuno, ovino y caprino sano (De Alwis, 1992; Brogden *et al.*, 1998; Donachie, 2007; Radostits y Done, 2007; Martín Espada y Cid Vázquez, 2013; Constable *et al.*, 2016).

CARACTERÍSTICAS, TAXONOMÍA Y FILOGENIA

M. haemolytica es un cocobacilo *gram*-negativo que presenta tinción bipolar con las tinciones Giemsa y Wright (Boyce *et al.*, 2008), inmóvil, anaeróbico facultativo, capsulado, catalasa y oxidasa positivo, no formador de esporos y ligeramente hemolítico (De Alwis, 1992). Es comensal de las membranas mucosas del tracto respiratorio superior de mamíferos sanos (Rice *et al.*, 2007).

M. haemolytica es la especie tipo del género *Mannheimia*. Pertenece al anteriormente conocido como complejo *Pasterurella haemolytica* y ha sufrido varias reclasificaciones a lo largo del tiempo. Theodore Kitt describió el *Bacterium bipolare multocidum* en 1885 (Highlander, 2001; Zecchinon *et al.*, 2005). En 1896 Flugge la renombra *Bacillus bovis septica* (Highlander, 2001). Posteriormente, en 1932, Newsom y Cross cambian su nomenclatura a *Pasteurella haemolytica* (Tefera y Simola, 2001). Smith, en 1961, describe dos biotipos de *P. haemolytica* basándose en características fenotípicas, epidemiológicas y patológicas. Clasificó estos biotipos en A y T, según su capacidad para fermentar la L-arabinosa o la trehalosa, respectivamente (Smith, 1961). Previamente, en 1960, Biberstein y colaboradores establecieron un sistema de serotipificación basado en la hemoaglutinación indirecta (HAI) de antígenos capsulares solubles (Biberstein *et al.*, 1960), para, en 1962, informar sobre una asociación entre los serotipos y los biotipos que permitió una serotipificación capsular de *P. haemolytica* (Biberstein y Gills, 1962). Así, los serotipos 3, 4, 10 y 15 se asociaron con el biotipo T y el

resto con el biotipo A. Los serotipos T3, T4, T10 y T15, del biotipo T, se reclasificaron como una especie diferente, que se denominó *Pasteurella trehalosi* en base a los estudios de hibridación ADN-ADN, propiedades bioquímicas y análisis genéticos (Sneath y Stevens, 1990). En 1995 se aisló un nuevo serotipo de *P. haemolytica*, el A17 (Younan y Fodar, 1995). Merced a estudios de ribotipado, electroforesis de enzimas multilocus, secuenciación del gen 16S del ARNr e hibridación ADN-ADN, se reclasificaron los serotipos de *P. haemolytica* A como un nuevo género: el género *Mannheimia* (Angen *et al.*, 1999). Esto llevó a crear el género *Mannheimia* que incluye las especies de *M. haemolytica* (los serotipo del antiguo biotipo A) y *M. glucosida* (A11), ambas asociadas a los procesos neumónicos, y otras especies como *M. ruminalis* o *M. varigena* no asociadas a respiratorio (Angen *et al.*, 1999). El serotipo A11 se reclasificó en *M. glucosida* (Angen *et al.*, 1999), basándose en los resultados de hibridación de ADN y secuenciación del 16S. En 2007, *P. trehalosi* se reclasificó como *Bibersteinia trehalosi* (Blackall *et al.*, 2007).

SEROTIPOS

Actualmente se reconocen 12 serotipos de *M. haemolytica* (A1, A2, A5, A6, A7, A8, A9, A12, A13, A14, A16 y A17) (Angen *et al.*, 1999; Donachie, 2007; Rice *et al.*, 2007; Constable *et al.*, 2016; Fernández *et al.*, 2016). La especie *M. haemolytica* incluye los serotipos del biotipo A de la antigua *Pasteurella haemolytica*, excepto el A11. Aproximadamente el 10% de los aislamientos de los rumiantes son no tipificables (Ackermann y Brogden, 2000; Zecchinon *et al.*, 2005; Martín Espada y Cid Vázquez, 2013; Fernández *et al.*, 2016).

Los serotipos A1 y, más recientemente, el A6 son los que se asocian comúnmente con enfermedad respiratoria en bovinos (Constable *et al.*, 2016). El serotipo A2 se aísla del tracto respiratorio superior de terneros sanos, por lo que se consideran habitantes comensales de la nasofaringe y amígdalas de terneros (Dabo *et al.*, 2007; Rice *et al.*, 2007; Boyce *et al.*, 2010; Wilson y Ho, 2013). En cambio, la variedad de serotipos asociados a la pasteurelosis neumónica en ovinos y caprinos es mucho mayor que en el ganado bovino. El serotipo A2 se considera el más frecuente en los ovinos (Adlam y Rutter, 1989), pero se han aislado una gran variedad de serotipos asociadas a procesos neumónicos en pequeños rumiantes, especialmente A2, A6, A7,

A8, A9 y A12 (Angen et al., 1999; Fodor et al., 1999; Kirkan y Kaya, 2005; Villard et al., 2006; Fernández et al., 2016).

FACTORES DE VIRULENCIA

Polisacárido capsular (CP): El polisacárido capsular de *M. haemolytica* serotipo A1 se compone de repeticiones de disacáridos de ácido N-acetilmanosaminurónico (ManNAcA) β -1,4 unido a N-acetilmanosamina (ManNAc) (Adlam *et al.*, 1984). El CP puede interactuar con el surfactante pulmonar, facilitando así la adherencia local del organismo a diferentes células del huésped (Brogden *et al.*, 1989; Highlander, 2001).

Lipopolisacárido (LP): Los LPs causan hipersensibilidad que puede exacerbar la inflamación y el daño por una reacción localizada de Arthus o Shwartzmann en el pulmón (Ramírez-Romero *et al.*, 2000). Los LPs constituyen el principal antígeno de superficie y se definió el serotipo somático de *Mannheimia spp.* de acuerdo con sus componentes antigénicos estructurales. Los serotipos *M. haemolytica* del biotipo A poseen LPs de tipo “rugoso”, mientras que el biotipo T contiene LPs de tipo “lisos”. Los LPs también estimulan la liberación de Factor de Necrosis Tumoral (TNF), macrófagos alveolares, y citoquinas (Breider *et al.*, 1990; Bienhoff *et al.*, 1992; Highlander, 2001).

Proteínas de la membrana externa (OMP): Las proteínas de la membrana externa y las lipoproteínas de *M. haemolytica* pueden estar implicadas en la sensibilidad al suero (Adamu, 2007) y se cree que son antígenos protectores importantes. Los anticuerpos dirigidos contra algunos de estos antígenos son capaces de inducir fagocitosis y muerte por medio del complemento (Adamu, 2007), y por lo tanto son de interés como posibles vacunas. Los perfiles de OMP varían dentro y entre los serotipos (Davies y Donachie, 1996).

Fimbrias y Adhesinas: La adhesión de *M. haemolytica* a las células del hospedador se produce en el momento de la colonización, debido a la unión a moléculas presentes en las superficies de las células del hospedador (Adamu, 2007). En *M. haemolytica* se han descrito dos tipos de fimbrias (Adamu, 2007). Sin embargo, estas estructuras no se han caracterizado en detalle y su presencia no parece ser una característica universal de los aislados de *M. haemolytica* (Adamu, 2007).

Leucotoxinas (LKT): *M. haemolytica* secreta una leucotoxina de 102 kD (LktA) que es una citotoxina dependiente de calcio perteneciente a la familia de toxinas RTX (Adamu, 2007). Se han identificado genes y proteínas de leucotoxina en todos los serotipos (Burrows *et al.*, 1993) y casi todos los aislados examinados secretan la toxina (Saadati *et al.*, 1997). La LktA es específica de especie, teniendo actividad leucotóxica sólo contra células linfoides de rumiantes y es débilmente hemolítica (Adamu, 2007). En altas concentraciones, la toxina crea poros en la membrana celular que conducen a la lisis de la misma (Adamu, 2007). En concentraciones menores, la toxina activa neutrófilos, induce la producción de citoquinas proinflamatorias, produce cambios en el citoesqueleto y causa apoptosis (Adamu, 2007). Se cree que estas dos acciones combinadas perjudican los mecanismos de defensa primaria de los pulmones y participan en la inflamación y la destrucción tisular típica de la pasteurelosis neumónica (Adamu, 2007). La leucotoxina está codificada por un grupo de cuatro genes que incluye el gen de la estructura de 963 aminoácidos, lktA, y los genes que se requieren para su acilación postraducciona (lktC) y secreción (lktB y lktD) (Highlander, 2001).

Glicoproteasa: Todos los tipos de *M. haemolytica* producen una metaloglicoproteasa de zinc que tiene actividad contra la O-sialoglicoproteína (Abdullah *et al.*, 1990). Se ha estudiado como actúa esta glicoproteasa a nivel de la superficie celular para facilitar la adhesión ya que su actividad in vitro puede potenciarse mediante coincubación con leucotoxina (Nyarko *et al.*, 1998). Como consecuencia de esta actividad se ha observado agregación plaquetaria y depósito de estos agregados en los alvéolos pulmonares (Nyarko *et al.*, 1998).

Neuraminidasa: Se ha observado que la neuraminidasa producida por *M. haemolytica* actúa en la colonización (Adamu, 2007). Ésta es producida por los 17 serotipos clásicos de *M. haemolytica* (Adamu, 2007), y la producción de neuraminidasa por *M. haemolytica* A1 es máxima in vitro (Adamu, 2007), lo que sugiere su intervención durante la infección.

Pasteurella multocida

P. multocida es una de bacterias de mayor prevalencia (Wilson y Ho, 2013). Se encuentra ampliamente distribuido en todo el mundo y afecta, tanto a animales domésticos incluyendo perro y gato, vacas, ovejas, cabras, cerdos, aves, conejos (Brogden *et al.*, 1978; Gilmour, 1978; Adlam y Rutter, 1989; Rimler, 1989; Brogden *et al.*, 1998; Lainson *et al.*, 2002; Davies *et al.*, 2003; Dabo *et al.*, 2007), como a animales silvestres (Weiser *et al.*, 2003; Besser *et al.*, 2013) y al hombre (Wilson y Ho, 2013). Generalmente se encuentra formando parte de la microbiota normal de la cavidad oral, nasofaringe y el tracto respiratorio superior (Boyce *et al.*, 2010; Wilson y Ho, 2013). *P. multocida* se considera generalmente como un patógeno oportunista en los procesos respiratorios de los bovino debido a su amplia distribución y a la diversidad genética de los aislados de la nasofaringe del ganado bovino (Taylor *et al.*, 2010c).

No obstante, *P. multocida* es capaz de causar enfermedad en una amplia gama de especies animales, que va desde inflamación asintomática o leve de las vías respiratorias altas, hasta procesos agudos que, a menudo, pueden ser mortales, procesos neumónicos y/o sistémicos (Wilson y Ho, 2013). Algunas cepas de *P. multocida* causan enfermedades específicas como el cólera aviar, la rinitis atrófica progresiva del cerdos y la septicemia hemorrágica en bovinos y búfalos (Boyce *et al.*, 2010; Wilson y Ho, 2013). En ovino, *P. multocida* produce generalmente bronconeumonía, pasteurelisis neumónica, una enfermedad compleja y económicamente importante que causa mortalidad en corderos y pérdida de la ganancia de peso (Goodwin *et al.*, 2004; Lacasta *et al.*, 2008). En la Tabla 1.1. se pueden ver algunas enfermedades causadas por *P. multocida* en animales de producción y domésticos, a diferencia de las producidas por *M. haemolytica* limitadas a los rumiantes (De Alwis, 1992).

Tabla 1.1. Enfermedades causadas por *M. haemolytica* y *P. multocida* en animales de producción.

	Especie	Enfermedad
<i>M. haemolytica</i>	Rumiantes	Pasteurelosis neumónica
<i>P. multocida</i>	Bovino	Pasteurelosis neumónica Septicemia hemorrágica
	Ovejas y Cabras	Pasteurelosis neumónica
	Cerdos	Rinitis Atrófica Pasteurelosis neumónica Neumonía enzoótica Septicemia
	Aves	Cólera Aviar
	Conejos	Rinitis («snuffles») Pasteurelosis neumónica Septicemia Abscesos Mastitis y piómetra

CARACTERÍSTICAS, TAXONOMÍA Y FILOGENIA

P. multocida es un cocobacilo gram negativo, que presenta tinción bipolar con las coloraciones Giemsa y Wright (Boyce *et al.*, 2008). Es anaerobio facultativo, inmóvil, capsulado, no forma esporos y no produce hemólisis. Como característica distintiva, posee un olor característico ya que produce indol en gran cantidad (Rimler, 1997; Koneman y Giovanniello, 2008).

La familia *Pasteurellaceae* es muy heterogénea, y se ha visto sometida a reclasificaciones a lo largo del tiempo y, aún hoy, se continúan estudiando sus relaciones taxonómicas. La especie tipo del género *Pasteurella* es *Pasteurella multocida* (Trevisan, 1887; Lehmann y Neumann, 1899; Rosenbusch y Merchant, 1939; Mannheim y Carter,

1984; Mutters *et al.*, 1985). En 1985, Mutters (Mutters *et al.*, 1985), planteó una nueva subdivisión de esta especie en tres subespecies que podrían clasificarse como especies distintas: *multocida*, *septica* y *gallicida*, basándose en la hibridación ADN-ADN, pero desde el punto de vista clínico no se consideró de utilidad (Davies, 2004). También demostraron que en función del patrón de fermentación del dulcitol y del sorbitol se podrían diferenciar las tres subespecies. La subespecie *multocida* es la que se presenta con mayor frecuencia en todo tipo de especies, en cambio, las subespecies *gallicida* y *septica* se presentan con menor frecuencia (Mutters *et al.*, 1985). Datos más recientes basados en electroforesis enzimática multilocus (MLEE) y ribotipado indican que las tres subespecies de *P. multocida* no representan grupos genotípicos distintos (Davies, 2004).

EPIDEMIOLOGÍA

La distribución de *P. multocida* es mundial, lo que explica las graves pérdidas económicas que produce en ganadería (Boyce *et al.*, 2010). Puede actuar como agente secundario en otras patologías o producir patología tras la presentación de factores predisponentes (Boyce *et al.*, 2010). Produce distintas enfermedades en múltiples especies incluyendo la humana (Wilson y Ho, 2013).

El mecanismo de transmisión más frecuente de *P. multocida* es el horizontal, mediante la formación de aerosoles o la ruta fecal-oral, por ingestión de alimentos o agua contaminados (Rosen, 1975; Boyce *et al.*, 2010). Los casos de zoonosis suelen ser por mordeduras o arañazos de perros o gatos (Wilson y Ho, 2013).

P. multocida no es capaz de persistir mucho tiempo en el medio ambiente y su viabilidad depende de las condiciones de temperatura y humedad del medio en el que se encuentra (Rosen, 1975; Backstrand y Botzler, 1986). Por ejemplo, *Pasteurella spp* puede permanecer viable en agua o en suelo más de 20 días, pero permanecer expuesta al sol la inactiva en sólo 10 minutos (Olson y Bond, 1968; Rosen, 1975; Backstrand y Botzler, 1986; Bredy y Botzler, 1989). No obstante, puede sobrevivir durante largos periodos en materia orgánica (Bredy y Botzler, 1989). Se inactiva por calor a 60°C o mediante agentes químicos, como el fenol al 0,5% (Smith y Philips, 1990).

TIPOS CAPSULARES, SEROTIPOS Y BIOTIPOS

P. multocida se clasifica en 5 tipos capsulares: A, B, D, E y F (Townsend *et al.*, 1998; Boyce *et al.*, 2000; Townsend *et al.*, 2001; Boyce *et al.*, 2008) y 16 serotipos somáticos: 1-16 (Boyce *et al.*, 2000; Boyce *et al.*, 2008). Mientras que los serotipos B y E de *P. multocida* se asocian con septicemia hemorrágica en rumiantes (Watson y Davies, 2002; Rad *et al.*, 2011), el serotipo A y el D son los principales patógenos asociados con enfermedades respiratorias en rumiantes (Rimler, 1989; Dabo *et al.*, 2007).

Entre las cepas de *P. multocida* se observa una gran variación en cuanto a la predilección por un hospedador u otro, patogenicidad, fermentación de hidratos de carbono, morfología de las colonias y especificidad antigénica (Carter, 1955; Rhoades y Rimler, 1987; Rimler, 1989). Para clasificar los aislados de *P. multocida* se desarrolló una prueba de hemaglutinación indirecta basada en las diferencias serológicas en el antígeno capsular de tipo-específico de *P. multocida* que reconoce cinco tipos capsulares distintos, como hemos visto, A, B, D, E, y F (Heddleston *et al.*, 1972; Rimler y Rhoades, 1987; Rimler, 1989; Fegan *et al.*, 1995). Para una identificación rápida del tipo capsular, Townsend desarrolló un protocolo de PCR múltiple (Townsend *et al.*, 2001).

La técnica de precipitación en agar gel describe 16 serotipos (1-16), basándose en los antígenos lipopolisacáridos somáticos (Namioka y Murata, 1961a; b; Heddleston *et al.*, 1972; Rhoades y Rimler, 1987). Atendiendo al patrón de utilización de diferentes azúcares y enzimas, Fegan en 1995 y Blackall en 1997, describieron 13 biotipos (1-10 y 12-14), (Fegan *et al.*, 1995; Blackall *et al.*, 1997). En algunas ocasiones, se han aislado cepas no capsuladas y/o no clasificables en ningún serotipo. Estos aislados proceden fundamentalmente de aves (Rhoades y Rimler, 1987; Wilson *et al.*, 1993).

FACTORES DE VIRULENCIA

Algunas cepas de los serotipos A y D de *P. multocida* producen una toxina denominada toxina de *P. multocida* (*Pasteurella multocida* toxin, PMT). La PMT es una proteína citotóxica de 146 kDa que actúa a través de vías complejas de señalización intracelular (Boyce *et al.*, 2010). Las cepas toxigénicas del serotipo D de *P. multocida* son las causantes de la rinitis atrófica porcina (Boyce *et al.*, 2010). La PMT termolábil puede

inducir la producción de neumonía, pleuritis, atrofia de bazo, atrofia de los cornetes nasales y necrosis hepática aguda cuando se inocula en conejos, pero se desconoce su implicación, aparte de la rinitis atrófica, en las enfermedades de campo (Suckow *et al.*, 1991; Suckow, 2000). Algunas cepas que producen PMT parecen no ser virulentas (Rimler y Brogden, 1986) y la mayoría de las cepas de *P. multocida*, incluidas las que producen neumonías en bovino y porcino no producen PMT (Boyce *et al.*, 2010).

Muchas cepas de *P. multocida* producen un polisacárido capsular de composición diferente según el serotipo. La cápsula del serotipo A contiene ácido hialurónico, mientras que las cápsulas del serotipo D y F contienen heparina y condroitina, respectivamente (Boyce *et al.*, 2010). La estructura de los polisacáridos capsulares de los serotipos B y E no se ha determinado (Boyce *et al.*, 2010). La cápsula es importante en la protección de las bacterias frente a los mecanismos inmunitarios del hospedador (Boyce *et al.*, 2010). Además, se ha demostrado que la cápsula del serotipo A media la adhesión a macrófagos alveolares y monocitos de sangre periférica de pavo (Boyce *et al.*, 2010).

Además de la toxina PMT y del antígeno capsular se han descrito otros factores asociados a la patogenicidad en *P. multocida* incluyendo factores de colonización y adherencia, proteínas relacionadas con el metabolismo del hierro, enzimas extracelulares como la neuraminidasa y la superóxido-dismutasa y hialuronidasa y proteínas externas de membrana y se han identificado los genes que los codifican (Boyce *et al.*, 2010). La mayoría de los genes asociados a la virulencia están presentes en la mayoría de las cepas de diferentes hospedadores y enfermedades producidas por *P. multocida* (Ewers *et al.*, 2006). En el análisis de la secuencia del genoma de la cepa PM70 de *P. multocida* se han identificado más de cien genes posiblemente asociados a factores de virulencia (Boyce *et al.*, 2010). Sin embargo, los genes *toxA*, *tbpA*, *hgbB*, y *pfhA* muestran mayor variabilidad en su prevalencia (Ewers *et al.*, 2006; Garcia-Alvarez *et al.*, 2015). Por lo tanto, estos cuatro genes se han propuesto, junto con los genes de biosíntesis de la cápsula, como marcadores epidemiológicos en cepas de campo (Ewers *et al.*, 2006).

EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR

Según la OMS, “la epidemiología es la ciencia que se encarga del estudio de la distribución y los determinantes de estados o eventos (en particular de enfermedades) relacionados con la salud y la aplicación de esos estudios al control de enfermedades y otros problemas de salud (<http://www.who.int/topics/epidemiology/es/>)”. En 1993, Schulte definió la esencia de la Epidemiología Molecular de una forma muy sencilla: “la incorporación de variables moleculares en la investigación epidemiológica” (Schulte y Perera, 1993). Así, la Epidemiología Molecular está basada en la Epidemiología clásica general y, para definir la distribución de la enfermedad y de sus determinantes etiológicos, utiliza a la Biología Molecular. Por lo tanto, permite realizar los estudios epidemiológicos mediante la utilización de técnicas moleculares, combinando la epidemiología analítica con métodos avanzados de laboratorio (O'Sullivan y Klaenhammer, 1993).

La tipificación molecular es una herramienta fundamental en los estudios epidemiológicos. Las técnicas de tipificación se han clasificado tradicionalmente en fenotípicas, que están basadas en características bioquímicas o fisiológicas de los microorganismos, y genotípicas o moleculares, que se basan en el estudio del ADN (Fernández Cuenca *et al.*, 2013).

La técnica de tipificación elegida va a depender de los requerimientos y características del microorganismo que va a ser analizado, pero el método de tipificación elegido debe ser evaluado según la capacidad que éste tenga para aportar la información epidemiológica necesaria. Struelens propuso los siguientes criterios para poder evaluar la conveniencia y efectividad de un método de tipificación (Struelens, 1998):

Capacidad de identificación: proporción de aislados que el método es capaz de detectar y asignar a un tipo concreto. En condiciones ideales, el método de detección escogido debería permitir la identificación y tipificación de todos los aislados analizados.

Reproducibilidad: un método de tipificación debe poder ser reproducido o replicado, aportando resultados reproducibles entre diferentes ensayos y estables para una cepa dada obtenida de diferentes orígenes.

Estabilidad: el marcador biológico detectado por el método deberá poder ser determinado a lo largo del tiempo y no depender, de forma importante, de las variaciones en el genoma del microorganismo o de su patrón de expresión genética.

Poder discriminatorio: el método de tipificación escogido debe ser capaz situar, con probabilidad elevada, aislamientos no relacionados en grupos diferentes.

Concordancia epidemiológica: el método debe ser capaz de aportar resultados similares a los obtenidos a través de otras técnicas.

Eficacia: el balance entre el coste económico generado por la aplicación del método y las ganancias derivadas de la prevención y control de la enfermedad conseguidos.

El método de tipificación debe tener, además, facilidad de aplicación, rapidez en la obtención de resultados, sencillez de interpretación y la versatilidad del procedimiento para su aplicación a diversos organismos. Las técnicas de tipificación fenotípica se usan cada vez con menos frecuencia debido a que presentan problemas de baja reproducibilidad y poder de discriminación ya que muchos de estas técnicas tienen límites a la hora de establecer diferencias o similitudes concluyentes entre microorganismos (Coll *et al.*, 2005). Sin embargo, algunas técnicas fenotípicas, como el perfil de resistencia antimicrobiana siguen siendo útiles para detectar nuevos fenotipos de resistencia (Fernández Cuenca *et al.*, 2013). El método de tipificación elegido no siempre es capaz de cumplir con todos los criterios utilizados para su evaluación, por lo cual, es recomendable el uso combinado de diversas técnicas, tanto fenotípicas como moleculares (Struelens, 1998).

MÉTODOS DE TIPIFICACIÓN MOLECULAR

Las técnicas moleculares de tipificación se basan en el estudio de los ácidos nucleicos de los microorganismos, por lo que son capaces de determinar la posible relación entre aislamientos relacionados epidemiológicamente y la posible evolución a partir de un microorganismo precursor común (grupo clonal, *clonal complex*). Además, son técnicas capaces de diferenciar aislamientos no relacionados, aunque pertenezcan a la misma especie microbiológica (Coll *et al.*, 2005). Los métodos de tipificación molecular, a diferencia de las técnicas fenotípicas, pueden aplicarse a un mayor número de especies microbianas, tienen mayor poder de discriminación, son más reproducibles y tienen mayor poder de discriminación (Tenover *et al.*, 1995; Tenover *et al.*, 1997; Struelens, 1998). El interés de estas técnicas radica además en su capacidad para establecer la relación genética que existe entre aislados. Esto permite distinguir los aislados implicados en un brote, además de ser herramientas muy útiles para confirmar la fuente de infección o reservorio (Fernández Cuenca *et al.*, 2013).

“MULTILOCUS SEQUENCE TYPING” (MLST)

La técnica precursora del análisis por MLST fue el análisis de isoenzimas o MLEE (*multilocus enzyme electrophoresis*), un método de tipificación fenotípica, utilizado en procariotas y en eucariotas que posee un alto poder discriminatorio y de detección/determinación de clones con independencia de su estabilidad (Selander *et al.*, 1986). El MLEE es un método indirecto de tipificación genética, que analiza la movilidad electroforética de enzimas metabólicas (entre 15 y 20) en geles de agarosa o poliacrilamida. Las variaciones observadas en estas movilidades corresponden con variaciones en el *locus* codificante de cada enzima (Vazquez y Berron, 2004).

Cada variante se define como “variante alélica” y los diferentes alelos de cada uno de los genes conforman el “perfil alélico”, que a su vez define el “tipo electroforético” (Chan *et al.*, 2001). Sin embargo, como la técnica está basada en la generación de patrones de bandas en geles, posee los inconvenientes de la interpretación y comparación de los datos generados como imágenes o fotografías. De esta manera, la secuenciación de ADN ha permitido el desarrollo de técnicas de tipificación mediante MLST manteniendo la filosofía del MLEE (Maiden *et al.*, 1998).

La técnica de *Multilocus Sequence Typing* (MLST), consiste en la tipificación de una cepa bacteriana mediante la detección de pequeñas variaciones en las secuencias de ADN de genes muy conservados, denominados “*housekeeping*”, que generalmente codifican diferentes enzimas con funciones metabólicas esenciales (Spratt, 1999). Estas variaciones en los *loci* se detectan directamente por secuenciación del ADN de fragmentos de los genes seleccionados y Las combinaciones alélicas encontradas de los distintos genes conservados seleccionados, definen lo que se conoce como el perfil alélico, Tipo de Secuencia o *Sequence Type* (ST) (Vazquez y Berron, 2004; Vélchez y Alonso, 2009). El MLST asigna diferentes tipos (alelos) según las variaciones en la secuencia de los genes estudiados, no según la movilidad electroforética del enzima codificante, como sucede en el MLEE (Maiden *et al.*, 1998), permitiendo la identificación de todas las variaciones alélicas de grupos de microorganismos con genotipos idénticos (clones) o altamente relacionados (líneas clonales) (Vazquez y Berron, 2004). Es un método de tipificación altamente reproducible y de alto poder discriminatorio (Spratt, 1999), pero que necesita el análisis de varios *loci* para obtener buenos resultados, aumentando los costes (Feil *et al.*, 2004)

La gran ventaja del MLST es que la secuencia de ADN es un dato objetivo y fácilmente intercambiable entre diferentes laboratorios mediante archivos informáticos (Vazquez y Berron, 2004). Sin embargo, debemos tener en cuenta que el proceso de selección de los genes no es el mismo para todas las especies: en cada especie se deben seleccionar los genes que constituirán el esquema de MLST, así, el método es de aplicación universal, pero su desarrollo, no (Vazquez y Berron, 2004).

La técnica de MLST se describió por primera vez en 1998 para *Neisseria meningitidis* (Maiden *et al.*, 1998) utilizando fragmentos de 7 *loci* de genes conservados (“*housekeeping*”), de unos 500 pares de bases y se han desarrollado esquemas para distintas especies de bacterias, como *Streptococcus pneumoniae* (Enright y Spratt, 1998), *Staphylococcus aureus* (Enright *et al.*, 2000), *Campylobacter jejuni* (Dingle *et al.*, 2001), *Enterococcus faecium* (Homan *et al.*, 2002) o *Pasteurella multocida*, y se pueden encontrar esquemas para distintas especies bacterianas en las correspondientes bases de datos: <https://pubmlst.org/databases/> y <http://www.mlst.net/>.

La utilidad de la MLST es principalmente epidemiológica. Permite determinar la estructura de las poblaciones de un microorganismo, ya que identifica variaciones que se acumulan lentamente en genes muy conservados dentro de la población bacteriana (Maiden *et al.*, 1998; Dingle *et al.*, 2001). Las distintas bases de datos creadas por MLST contienen las secuencias de los alelos de referencia y los tipos de secuencia para cada organismo, además de información sobre las muestras epidemiológicas. Normalmente, las páginas web facilitan aplicaciones de consulta y análisis que permiten consultar las secuencias alélicas y los tipos de secuencia, tanto de cepas de referencia como de distintas cepas procedentes de aislados de campo. La mayoría de las bases de datos de MLST están albergadas en servidores web emplazados en el Imperial College de Londres (mlst.net) y en la Universidad de Oxford (pubmlst.org). Estas bases de datos establecen secuencias alélicas de referencias específicas para los organismos y listas de los tipos de secuencia para los organismos individuales (Perez-Losada *et al.*, 2013).

El desarrollo del esquema para la tipificación de *M. haemolytica* por MLST se llevó a cabo por Petersen en 2009 (Petersen *et al.*, 2009). Para ello, se seleccionaron siete genes conservados: *adk*, *aroE*, *deoD*, *gapDH*, *gnd*, *mdh* y *zwf* (Tabla 1.2.). La elección de estos genes se basó en los esquemas de MLST existentes para otras bacterias y en los análisis previos mediante electroforesis enzimática multilocus (MLEE) de *M. haemolytica* (Petersen *et al.*, 2009).

En cuanto a *P. multocida*, se desarrolló el esquema MLST *Multi-host* para investigar las relaciones evolutivas entre los aislados de *P. multocida* procedentes de bovinos, ovinos, porcinos y aves (Davies *et al.*, 1997). Este esquema MLST se basa en el análisis comparativo de la secuencia de nucleótidos de los fragmentos de los siete genes conservados codificantes para enzimas en función de sus ubicaciones en el cromosoma y las diferentes funciones de las enzimas codificadas (Tabla 1.3.). Estos genes son *adk*, *aroA*, *deoD*, *gdhA*, *g6pd*, *mdh* y *pgi* (Davies *et al.*, 2004; Hotchkiss *et al.*, 2011).

Tabla 1.2. Genes del esquema MLST de *M. haemolytica*.

GEN	ENZIMA CODIFICADA	FUNCIÓN
Adk	Adenilato ciclasa	Biosíntesis de nucleótidos
aroA	Shikimato deshidrogenasa	Biosíntesis de aminoácidos
deoD	Purín nucleosido fosforilasa	Biosíntesis de nucleótidos
gapDH	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa	Metabolismo energético
Gnd	6-fosfogluconato deshidrogenasa	Metabolismo energético
Mdh	Malato deshidrogenasa	Metabolismo energético
Zwf	Glucosa-6-fosfato 1-deshidrogenasa	Metabolismo energético

Tabla 1.3. Genes del esquema MLST Multi-host de *P. multocida*.

GEN	ENZIMA CODIFICADA	FUNCIÓN
Adk	adenilato ciclasa	Biosíntesis de nucleótidos
aroA	3-fosfoshikimato-1-carboxivinil transferasa	Biosíntesis de aminoácidos
deoD	Purín nucleosido fosforilasa	Biosíntesis de nucleótidos
gdhA	glutamato deshidrogenasa	Biosíntesis de aminoácidos
g6pd	glucosa-6-fosfato 1-deshidrogenasa	Metabolismo energético
Mdh	malato deshidrogenasa	Metabolismo energético
Pgi	fosfoglucona isomerasa	Metabolismo energético; glucólisis

Existe otro esquema de MLST para *P. multocida*, desarrollado por Subaaharan para la “*Pasteurella multocida* Rural Industries Research and Development Corporation”, RIRDC por sus siglas en inglés (Subaaharan *et al.*, 2010). Este esquema fue diseñado originalmente para tipificar aislados aviares, que engloban la mayor parte de los datos alojados en la base de datos, aunque la comunidad internacional de investigadores ha venido utilizando el esquema RIRDC para realizar MLST y enviar datos relacionados con otras especies hospedadoras (Hotchkiss *et al.*, 2011). En concreto, esta base de datos MLST se creó utilizando 63 aislados de *P. multocida* de aves de corral australianas, todos asociados con brotes de cólera aviar. Los 63 aislados habían sido examinados en un

estudio previo basado en electroforesis de enzimas multilocus MLEE (Blackall *et al.*, 1998). Además, se incluyeron tres cepas de referencia internacionales, que representan las tres subespecies dentro de *P. multocida*. Para la realización de MLST por el esquema RIRDC se han seleccionado siete genes conservados codificantes para enzimas (Tabla 1.4.). Estos genes son *adk*, *est*, *pmi*, *zwf*, *mdh*, *gdh* y *pgi* (Subaaharan *et al.*, 2010).

Tabla 1.4. Genes del esquema MLST RIRDC de *P. multocida*.

GEN	ENZIMA CODIFICADA	FUNCIÓN
<i>adk</i>	Adenilato quinasa	Biosíntesis de nucleótidos
<i>est</i>	Esterasa	Metabolismo energético
<i>pmi</i>	Manosa-6-fosfato isomerasa	Glicólisis y la biosíntesis de polisacáridos capsulares.
<i>zwf</i>	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	Metabolismo energético
<i>mdh</i>	Malato deshidrogenasa	Metabolismo de la energía
<i>gdh</i>	Glutamato deshidrogenasa	Metabolismo del nitrógeno y del glutamato, mantenimiento de homeostasis
<i>pgi</i>	Fosfo-glucosa isomerasa	Metabolismo energético; glucólisis

ELECTROFORESIS DE CAMPO PULSADO (PFGE)

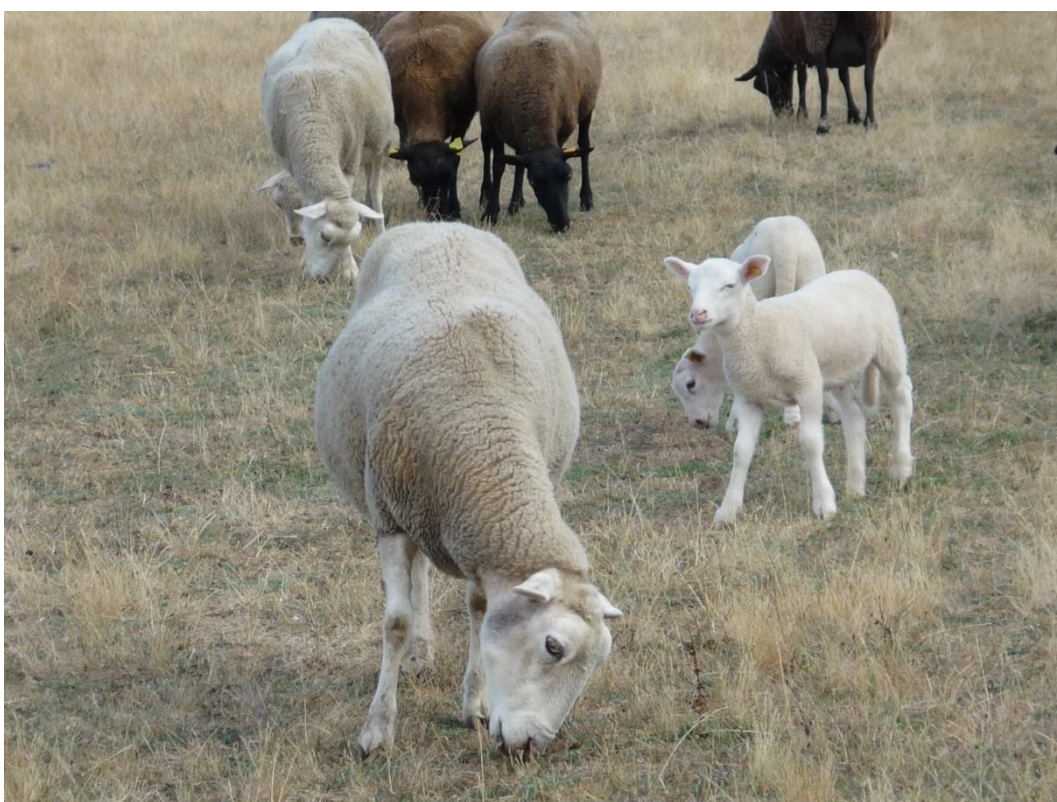
En 1984, Schwartz y Cantor desarrollaron un nuevo tipo de electroforesis (Schwartz y Cantor, 1984) basada en la aplicación de campos eléctricos mediante pulsos, con la que consiguieron separar cromosomas de levadura de gran tamaño. La Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (“*Pulse Field Gel Eletrophoresis*”, PFGE) es capaz de separar grandes fragmentos de DNA induciendo su reorientación mediante dichos cambios periódicos en el campo eléctrico (pulsos). La utilidad de la PFGE es similar a la de la electroforesis convencional, pero los fragmentos de ADN separados son de mayor tamaño, permitiendo el mapeo de grandes regiones de ADN e, incluso, de cromosomas de pequeño tamaño. La técnica, al igual que la electroforesis convencional, compara patrones de bandas, salvo que, al ser grandes fragmentos de ADN, deben ser generadas mediante digestión enzimática de todo el genoma bacteriano. Mediante el análisis, generalmente mediante programas informáticos, de los patrones de bandas obtenidos

mediante PFGE se puede observar si existen similitudes genéticas entre aislados aparentemente no relacionados y determinar si tienen la misma procedencia evolutiva (Tenover *et al.*, 1995; Galvao *et al.*, 2012). Como grandes inconvenientes de la PFGE están el tiempo necesario, su laboriosidad, y la necesidad de un equipo especial de electroforesis para el campo pulsado (Klima *et al.*, 2010).

La PFGE se ha utilizado en estudios epidemiológicos (Cardozo-Bernal *et al.*, 2013) de *Escherichia coli* (Ejrnaes *et al.*, 2006), *Salmonella* spp. (Olsen *et al.*, 1994), *Shigella* spp. (Angelini *et al.*, 2009), *Listeria* spp. (Galvao *et al.*, 2012; Cardozo-Bernal *et al.*, 2013), *Campylobacter* spp. (Behringer *et al.*, 2011), *Vibrio cholerae*, (Taneja *et al.*, 2012), etc.

En el estudio y tipificación de *M. haemolytica* es la técnica de elección, el “gold standard” (Kodjo *et al.*, 1999; Katsuda *et al.*, 2003; Villard *et al.*, 2006; Klima *et al.*, 2010; Timsit *et al.*, 2013; Omaleki *et al.*, 2016; Rainbolt *et al.*, 2016), al igual que para estudio y tipificación de *P. multocida*, ya que posee gran poder discriminatorio (Goering, 1993; Townsend *et al.*, 1997).

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS



La pasteurelosis neumónica ovina es un proceso complejo en cuanto su diagnóstico y su control debido a implicación de las infecciones concurrentes y de otros factores de riesgo que intervienen en su aparición. No obstante, la principal dificultad para el diagnóstico etiológico reside en que las principales bacterias implicadas, *M. haemolytica* y *P. multocida*, son residentes normales del tracto respiratorio superior de los rumiantes y su aislamiento de las vías respiratorias altas no tiene por si solo valor diagnóstico. Generalmente se considera que actúan como patógenos oportunistas que descienden del tracto respiratorio superior cuando se ven alteradas las defensas del hospedador. Sin embargo, muchos de los brotes tienen características que parecen indicar transmisión entre animales y un origen contagioso. Por tanto, no se descarta la existencia de clones más virulentos que actúen como patógenos primarios.

Ambas bacterias son microorganismos heterogéneos en los que se han descrito múltiples factores asociados de virulencia, algunos de ellos presente virtualmente en todas las cepas. En cuanto a los de distribución variable, ninguno de ellos o su combinación permite distinguir posibles patotipos asociados a la enfermedad. Es por ello que no es posible distinguir entre cepas comensales y posibles cepas patógenas si es que existe esa diferencia.

Estas limitaciones también implican una dificultad para el diseño de vacunas específicas para la prevención de la pasteurelosis neumónica. En ovino se asocian múltiples serotipos de *M. haemolytica* a este proceso, mientras que, las cepas de *P. multocida* asociadas a este proceso han sido poco caracterizadas.

En este estudio se pretende caracterizar los genotipos de los aislados de *M. haemolytica* y *P. multocida* que se asocian a las lesiones neumónicas en ovino.

Los objetivos específicos de esta tesis fueron:

1. Determinar los tipos de secuencia (STs) de los aislados de ovinos de *M. haemolytica* por MLST.
2. Analizar la diversidad y las relaciones genéticas de los aislados de *M. haemolytica* por electroforesis de campo pulsado (PFGE).
3. Comparar los STs, pulsotipos y perfiles de virulencia de los aislados de *M. haemolytica* de los aislados procedentes de pulmones con y sin lesiones neumónicas.

4. Determinar los tipos de secuencia (STs) de los aislados ovinos de *P. multocida* por MLST.
5. Determinar los perfiles de virulencia de *P. multocida* (“virulotyping”) y determinar la capacidad toxigénica de los aislados portadores del gen *toxA*.
6. Comparar los STs y perfiles de virulencia de los aislados de *P. multocida* ovino con los de otros hospedadores.

3. MATERIAL Y MÉTODOS



TIPIFICACIÓN DE *Mannheimia haemolytica*

AISLADOS DE *M. haemolytica* UTILIZADOS EN ESTE ESTUDIO

En este estudio se analizaron 121 aislados de *M. haemolytica* de origen ovino (Tabla 3.1.). Los aislados procedían de un estudio anterior sobre la epidemiología molecular de bacterias de la familia *Pasteurellaceae* que se asocian a las lesiones neumónicas de los corderos en matadero (Pinto, 2011). Los aislados se obtuvieron de pulmones de corderos con y sin lesiones neumónicas obtenidos durante 22 meses en tres mataderos diferentes situados en la periferia de Madrid (Tabla 3.1.). Se utilizaron para este estudio 75 aislados de *M. haemolytica* procedentes de lesiones neumónicas y 46 aislados procedentes de pulmones sin lesiones neumónicas (Tabla 3.1.). Los aislados se conservaron en CRIOTECA® -SKIM MILK (Microkit®) a -80° C.

Tabla 3.1. Origen y características de los aislados de *M. haemolytica*.

Matadero	Origen geográfico	Fecha muestreo	Lesiones neumónicas	Nº de aislados
Madrid Norte	Badajoz	18/02/2008	No	7
			Sí	4
		02/04/2008	No	12
			Sí	22
Colmenar Viejo	Cáceres	20/05/2008	No	2
			Sí	7
		18/06/2008	No	11
			Sí	16
		17/02/2009	No	5
			Sí	6
		03/03/2009	No	8
			Sí	9
Getafe	Madrid	11/03/2009	No	1
			Sí	11

“MULTILOCUS SEQUENCE TYPING” (MLST) DE *M. haemolytica*

Para la tipificación por MLST de *M. haemolytica* se utilizó el esquema desarrollado por Petersen (Petersen *et al.*, 2009) que se basa en los siete genes “housekeeping” *adk*, *aroE*, *deoD*, *gapDH*, *gnd*, *mdh* y *zwf*. Los protocolos están accesibles en la base de datos pública de MLST de *M. haemolytica* (<https://pubmlst.org/mhaemolytica/>).

Los aislados se cultivaron en agar sangre Columbia (COS medium, Biomérieux™) y se incubando a 37°C durante 24 horas. Para extraer el DNA genómico se tomó una única colonia y se resuspendió en 200 µl de agua milliQ estéril, para posteriormente, seguir el *método A* del protocolo propuesto por L. Clarke para la extracción de DNA de gram negativos por hervido o “*simple boiling*” (Clarke *et al.*, 2003). La suspensión bacteriana se sometía durante 10 minutos a 100°C en agitación continua de 600 r.p.m, en termobloque (Thermomixer Comfort™ 5355, Eppendorf™). Posteriormente se centrifugaba a 12.000g y 4° C durante 5 minutos en una centrifuga (Eppendorf™ 5415 R). Se utilizaron 2 µl de sobrenadante para llevar a cabo las reacciones de PCR y el resto del DNA se conservaba a -40° C.

Para la PCR se utilizaron los cebadores originales (Petersen *et al.*, 2009) modificados (Tabla 3.2.). Cada secuencia se modificó añadiendo al extremo 5' de cada cebador la secuencia del primer universal M13 correspondiente, directo (5'-GTAAACGACGGCCAGT) o reverso (5'-GCGGATAACAATTTCACACAGG) para facilitar la secuenciación. Todos los cebadores fueron sintetizados por Sigma™.

Para llevar a cabo las PCR de cada uno de los genes de *M. haemolytica*, según el protocolo descrito por Petersen (Petersen *et al.*, 2009), se utilizó el kit PCR Master Mix™ de Qiagen™. La mezcla de reacción se preparó en un volumen final de 25 µl que contenía 12,5 µl de Taq PCR Máster Mix™ (que contiene a su vez una mezcla de 2,5 unidades Taq DNA Polimerasa, tampón de PCR y dNTPs que proporcionan una concentración final de 200 µM de cada dNTP y 1,5 mM de MgCl₂), 2 µl del primer directo (forward) a 25 pmol/µl, 2 µl del primer inverso (reverse) a 25 pmol/µl, 6,5 µl de agua destilada de PCR y 2 µl de DNA de *M. haemolytica* (5-20 ng/ µl). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador MJ Mini™ Thermal Cycler

PTC-1148 (Bio-Rad™), utilizando los parámetros de amplificación propuestos por Petersen (Petersen *et al.*, 2009). Se llevó a cabo un ciclo inicial de desnaturalización a 94° C 3 minutos, seguido de treinta ciclos de desnaturalización a 94° C 30 segundos, alineamiento 55° C 30 segundos y extensión 72° C 1 minuto cada uno. Por último se programó un ciclo de extensión final a 72° C. 10 minutos y un ciclo final de conservación a 4° C sin límite de tiempo.

Tabla 3.2. Cebadores utilizados para la amplificación y secuenciación de los genes “housekeeping” en la técnica MLST de *M. haemolytica*.

Gen	Cebadores	Secuencia (5'>3')	bp
<i>adk</i>	M13_adkFW	GTAAAACGACGGCCAGTGCAAAGGTACGCAAGCTCAG	648
	M13_adkRV	GCGGATAACAATTTACACAGGAAAATTTTCGCTAACTCAGCAC	
<i>aroE</i>	M13_aroEFW	GTAAAACGACGGCCAGTGCTTCTGGAGCAAAAGGTTG	624
	M13_aroERV	GCGGATAACAATTTACACAGGCCTGTCCAACCAACATTCCT	
<i>deoD</i>	M13_deoDFW	GTAAAACGACGGCCAGTTCACACATTAACGCACCTG	620
	M13_deoDRV	GCGGATAACAATTTACACAGGGCTCCATACTCTGCCGCTAC	
<i>gapDH</i>	M13_gapDHFw	GTAAAACGACGGCCAGTCCGTATCGGTCGTATCGTTT	564
	M13_gapDHRV	GCGGATAACAATTTACACAGGTTTTGCGTTGCAGTAGTTGC	
<i>gnd</i>	M13_gndFW	GTAAAACGACGGCCAGTGTGATTGGACTCGCCGTAAT	595
	M13_gndRV	GCGGATAACAATTTACACAGGTTTCGATACCGTTGTGAACCA	
<i>mdh</i>	M13_mdhFW	GTAAAACGACGGCCAGTAGTAACCGGTTTTGCAGGTG	547
	M13_mdhRV	GCGGATAACAATTTACACAGGGCTTTTGCTCAACCACTTC	
<i>zwf</i>	M13_zwfFW	GTAAAACGACGGCCAGTTGATGAAGTCGCAAAAGTGC	715
	M13_zwfRV	GCGGATAACAATTTACACAGGACGGTTTTTCGCCATACTTTG	

Se confirmó la amplificación de los productos de PCR de *M. haemolytica* del tamaño esperado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Se utilizó 1 g de agarosa *Certified™ Molecular Biology Agarose* (Bio-Rad™), disuelto en 100 ml de tampón TBE 1X (Bio-Rad™), al que se añadieron 3 µl de SYBR® Safe disuelto en DMSO y concentrado 10.000X (Invitrogen™) como tinción fluorescente. Para la electroforesis se utilizó una cubeta *Wide Mini-Sub Cell GT Cell™* (Bio-Rad™) y una fuente de alimentación *PowerPac™ Basic Power Supply* (Bio-Rad™). La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 80 mV durante 60 min. Se utilizaron 2 µl de EZ Load™ 1 kb Molecular Ruler (Bio-Rad™) como marcador de peso molecular. Los tamaños esperados de banda para cada gen figuran en la Tabla 3.2.

Los productos de PCR obtenidos para cada gen de cada aislado de *M. haemolytica* se enviaron sin purificar a Macrogen Europe Inc (Ámsterdam, Países Bajos) para purificación y su secuenciación, que se realizó según los protocolos EZ-Seq™ de la empresa en el sistema Applied Biosystems™ 37370XL. La secuenciación de los genes de *M. haemolytica* se llevó a cabo en ambas direcciones usando el par de cebadores universales M13, directo (5'- GTAAAACGACGGCCAGT) y reverso (5'- GCGGATAACAATTTCACACAGG). Las muestras que se enviaban a secuenciación se preparaban añadiendo a 5 µl de producto de PCR y 5 µl del cebador a una concentración 10 pmol, según correspondiese directo o inverso.

Los datos de las secuencias se cargaron en la base de datos del sitio web de MLST de *M. haemolytica* (<https://pubmlst.org/mhaemolytica/>) para determinar el tipo de alelo. La combinación de los siete alelos determina el tipo de secuencia o ST (sequence type) de cada aislado.

ELECTROFORESIS EN GEL DE CAMPO PULSADO (PFGE)

Los aislados de *M. haemolytica* se analizaron por electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) siguiendo el protocolo descritos por Klima *et al.* (Klima *et al.*, 2010), con algunas modificaciones. Se inoculó una sola colonia de *M. haemolytica*, procedente de un cultivo en agar sangre a 37°C 18 horas, en 5 ml de medio LB (DIFCO) y se incubó a 37° C, con agitación a 200 rpm, durante 18 h. Las células bacterianas se lavaron con tampón PIV (10mMTris; 1 M NaCl, pH 7,6), se

resuspendieron en el mismo tampón y se ajustó a una concentración equivalente al tubo nº 5 de la escala de McFarland. Para preparar bloques de agarosa donde se inmoviliza el ADN cromosómico se añadió a la suspensión celular un volumen igual de agarosa de bajo punto de fusión (BioRad, Madrid, España) para obtener una concentración final de agarosa del 1%. Las células bacterianas en los bloques de agarosa se sometieron a lisis mediante una solución de lisis de EC conteniendo lisozima (100 µg/ml) y Rnasa (10 mg/ml). Después de incubar a 37°C durante 24 horas se retiraba la solución y se añadía solución de proteinasa K (0,2 mg/ml) y se incubaba a 50°C una noche. Después, se retiraba esta solución y se lavaban los bloques de agarosa con tampón TE (Tris-EDTA, Sigma) con agitación suave a temperatura ambiente varias veces. Los bloques se conservaban en buffer TE a 4°C.

El ADN cromosómico embebido en los bloques de agarosa se sometió a digestión con la enzima de restricción *SalI* (New England Biolabs, EE. UU.) a 37°C durante toda la noche siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN así digerido se cargó en un gel de agarosa de al 1% (BioRad, España) preparado con tampón TBE (Bio-Rad, España). La separación mediante PFGE se llevó a cabo en un campo eléctrico homogéneo mediante el aparato CHEF DRIII (Bio-Rad, Madrid, España). Las condiciones de electroforesis utilizadas fueron un voltaje de 6 V/cm con pulsos de 4-44 s durante 22 h a 14°C. Se usó como marcador de peso molecular el *Bacteriophage Lambda PFG Ladder* (New England Biolabs, EE. UU.). Los geles se tiñeron en una solución de SyBR Gold (Invitrogen, España) y se fotografiaron en un transiluminador UV. Los perfiles PFGE se analizaron utilizando el paquete de software BioNumerics (Applied Maths, Bélgica).

PERFILES DE VIRULENCIA

En los 121 aislados de *M. haemolytica* utilizados en este estudio se habría realizado previamente la detección de 16 genes asociados a la virulencia por PCR (Pinto, 2011). Los genes *lktA*, *tbpA*, *tbpB* y *tonB* estuvieron presentes en el 100% de los aislados analizados mientras que las tasas de detección para los restantes genes asociados a la virulencia fueron: *adh* (97,5%), *fhaC* (94,2%), *gcp* (79,3%) *hf* (79,0%), *irp* (59,5%), *lpsA* (65,0%), *nanH* (99,2 %), *pilA* (95,8%), *plpD* (95,8%), *pomA* (97,6%), *sodA* (91,7%) y *sodC* (19,0%) (Pinto, 2011). En función de la presencia o ausencia de

cada uno de los 16 genes, los aislados se clasificaron en 35 perfiles de virulencia (Pinto, 2011). Los perfiles de virulencia de los aislados de *M. haemolytica* (Pinto, 2011) se utilizaron para comparar los aislados procedentes de pulmones con y sin lesiones neumónicas y con los STs con el fin de establecer posibles asociaciones.

TIPIFICACIÓN DE *Pasteurella multocida*

AISLADOS DE *P. multocida* UTILIZADOS EN ESTE ESTUDIO

En este estudio se incluyeron 43 aislados de *P. multocida* procedentes de un estudio anterior sobre la epidemiología molecular de las bacterias de la familia *Pasteurellaceae* que se asocian a las lesiones neumónicas de los corderos en matadero (Pinto, 2011). Los aislados procedían de pulmones de corderos con y sin lesiones neumónicas obtenidos durante 22 meses en tres mataderos diferentes situados en la periferia de la región metropolitana de Madrid (Tabla 3.3.). Estos mataderos recibían animales de distintas explotaciones situadas en las comunidades autónomas de Madrid y Extremadura. Los aislados se identificaron como *P. multocida* por pruebas bioquímicas (Pinto, 2011). Los aislados se conservaron en CRIOTECA®-SKIN MILK (Microkit®) a -80° C. En el momento de su utilización las bacterias se cultivaron en placas de agar sangre Columbia (bioMérieux) a 37° 24h.

Tabla 3.3. Origen y características de los 43 aislados de *P. multocida*.

Matadero	Origen geográfico	Fecha	Lesiones Neumónicas	Nº aislados de <i>P. multocida</i>
Madrid Norte	Badajoz	18/02/2008	Sí	14
		02/04/2008	No	5
Getafe	Madrid	11/03/2009	Sí	1
			No	14
Colmenar Viejo	Cáceres	20/05/2008	Sí	6
		18/06/2008	No	1
		03/03/2009	Sí	1
		12/11/2008	No	1

DETECCIÓN DE GENES ASOCIADOS A LA VIRULENCIA DE *P. multocida*

La identificación se confirmó mediante un ensayo de PCR específico de especie (Townsend *et al.*, 1998). Los serotipos capsulares (A, B, D, E y F) se determinaron mediante PCR múltiple (Townsend *et al.*, 2001). Los genes asociados a la virulencia *toxA*, *tbpA*, *hgbB* y *pfhA* se detectaron mediante PCR múltiple según se ha descrito previamente (García-Alvarez *et al.*, 2015). Los cebadores utilizados para la identificación, la determinación del tipo capsular y de los factores de virulencia se detallan en la Tabla 3.4. Todos los cebadores fueron sintetizados por Sigma-Aldrich Co.

Para extraer el DNA genómico se tomó una sola colonia y se resuspendió en 200 µl de agua milliQ estéril, para posteriormente, seguir el *método A* del protocolo propuesto por L. Clarke para la extracción de ADN de gram negativos por hervido o “*simple boiling*” (Clarke *et al.*, 2003). Se hirvió la suspensión a 100°C mientras se sometía a agitación continua a 600 rpm, por medio de un Thermomixer Comfort™ 5355 (Eppendorf™) durante 10 minutos, para posteriormente centrifugar 5 minutos a 12.000 g y 4° C en una centrifuga Eppendorf™ 5415 R. Se utilizaron 2 µl de sobrenadante para llevar a cabo las reacciones de PCR. El resto del ADN se conservó a -40° C.

Las condiciones de la PCR para determinación del tipo capsular fueron las siguientes (Townsend *et al.*, 2001): desnaturalización inicial a 95° C durante 5 minutos, 30 ciclos de desnaturalización a 95° C durante 30 segundos, alineamiento a 55° C durante 30 segundos, extensión a 72° C durante 30 segundos, y una extensión final a 72° C durante 5 minutos. Se realizó un ciclo final de conservación a 4° sin límite de tiempo. Las condiciones para la detección de los genes de virulencia fueron las siguientes (García-Alvarez *et al.*, 2015): desnaturalización inicial a 95° C durante 5 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturalización a 94° C durante 45 segundos, alineamiento a 54° C durante 50 segundos y extensión a 72° C durante 50 segundos, para terminar con una extensión final a 72° C durante 10 minutos. Se realizó un ciclo final de conservación a 4° sin límite de tiempo.

Tabla 3.4. Cebadores utilizados en la determinación del tipo capsular y los factores de virulencia de los aislados de *P. multocida*.

	Gen	Nombre	Secuencia (5' -> 3')	bp
Identificación	KMT1	KMT1T7 KMT1SP6	ATCCGCTATTTACCCAGTGG GCTGTAAACGAACTCGCCAC	460
capA	<i>hyaD-hyaC</i>	CAPA-F CAPA-R	TGCCAAAATCGCAGTCAG TTGCCATCATTGTCAGTG	1.044
capB	<i>bcbD</i>	CAPB-F CAPB-R	CATTTATCCAAGCTCCACC GCCCCGAGAGTTTCAATCC	760
capD	<i>dcbF</i>	CAPD-F CAPD-R	TTACAAAAGAAAGACTAGGAGCCC CATCTACCCACTCAACCATATCAG	657
capE	<i>ecbJ</i>	CAPE-F CAPE-R	TCCGCAGAAAATTATTGACTC GCTTGCTGCTTGATTTTGTC	511
capF	<i>fcfD</i>	CAPF-F CAPF-R	AATCGGAGAACGCAGAAATCAG TTCCGCCGTCAATTACTCTG	851
ToxA	<i>toxA</i>	ToxA-F ToxA-R	TCTTAGATGAGCGACAAGG GAATGCCACACCTCTATAG	846
TbPA	<i>tbPA</i>	TbPA-F TbPA-R	TGGTTGGAAACGGTAAAGC TAACGTGTACGGAAAAGCC	728
HgbB	<i>hgbB</i>	HgbB-F HgbB-R	TCATTGAGTACGGCTTGAC CTTACGTCAGTAACACTCG	499
PfhA	<i>pfhA</i>	PfhA-F PfhA-R	AGCTGATCAAGTGGTGAAC TGGTACATTGGTGAATGCTG	275

Las PCR se llevaron a cabo en un termociclador de gradiente Mastercycler (Eppendorf™). Los productos generados por PCR se detectaron por electroforesis en gel de agarosa al 1,5% teñido con Syber Green 1x (Invitrogen SA). Como controles positivos para los genes de virulencia se usaron las cepas patrón de *P. multocida* ATCC 11039 (*capA*, *hgbB*), NCTC 10323 (*capB*, *tbpA*), NCTC 12178 (*capD*, *toxA*), NCTC 10326 (*capE*, *pfhA*) y C2040103 (*capF*).

DETECCIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE LA TOXINA PMT

La producción de la toxina en los aislados de *P. multocida* positivos al gen *toxA* se determinó mediante el ELISA comercial DAKO PMT ELISA Kit (Dako Cytomation Denmark A/S, Dinamarca). En este ensayo se analizaron un total de 58 aislados positivos al gen *toxA* incluyendo los aislados positivos al gen *toxA* utilizados en este estudio. La detección de PMT se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Los aislados de *P. multocida* se sembraron en agar sangre y se incubaron durante toda la noche a 37° C. El crecimiento de la placa se recogió con un asa de Digrafsky añadiendo 2 ml de agua destilada a la placa para tomar todas las colonias presentes en la placa. Se añadieron 200 µl de la muestra bacteriana obtenida a los pocillos de la placa en blanco (no tapizados), se cubrieron con cinta de sellado y se incubaron a 37° C durante toda la noche para obtener los extractos de PMT.

A continuación se añadieron 50 µl de estos extractos de PMT o los correspondientes controles a los pocillos tapizados con anticuerpos monoclonales anti-PMT. Se añadieron además 50 µl de conjugado anti-PMT y se incubaron a temperatura ambiente (24-25°C) durante 1 hora con agitación. Después de la etapa de incubación, se lavaron los pocillos y se añadió el sustrato cromógeno (100 µl). Se incubaron a temperatura ambiente 10 minutos y se añadió la solución stop. La presencia de antígeno PMT en los extractos de los cultivos bacterianos se evidenció por la aparición de color amarillo-dorado en los pocillos. La intensidad del color se midió en un espectrofotómetro Anthos Reader 2010 (Anthos Mikrosysteme GmbH, Alemania) a 490 nm y se comparó con la absorbancia obtenida para los controles positivo (PMT nativa, liofilizada y aislada por afinidad, incluida en el kit), y negativo (agua destilada).

“MULTILOCUS SEQUENCE TYPING” (MLST) MULTI-HOST DE *P. multocida*

Todos los aislados de *P. multocida* se tipificaron mediante el esquema de MLST Multi-host (<https://pubmlst.org/pmultocida/>) desarrollado por Robert Davies. La amplificación por PCR de los siete genes estructurales (*adk*, *aroA*, *deoD*, *gdhA*, *g6pd*, *mdh* y *pgi*) se llevó a cabo usando el ADN previamente extraído de los aislados de *P. multocida* mediante el protocolo ya descrito (Clarke *et al.*, 2003) y protocolos disponibles en dicha base de datos (http://pubmlst.org/pmultocida_multihost/). Los cebadores utilizados se muestran en la Tabla 3.5.

Tabla 3.5. Cebadores utilizados para la amplificación y secuenciación de los genes “housekeeping” en el esquema de MLST Multi-host de *P. multocida*.

Gen	Cebador	Secuencias (5'→3')	bp
Adk	M13_ADK-F	GTAAAACGACGGCCAGTAAGGBACWCAAGCVCAAT	531
	M13_ADK-R	GCGGATAACAATTTACACAGGCACTTTTKYGTMCCTGC	
aroA	M13_AROA-F	GTAAAACGACGGCCAGTTTTACCDGGYTCYAAAAG	558
	M13_AROA-R	GCGGATAACAATTTACACAGGCTTTYACVCGCCAGTTAT	
deoD	M13_DEOD-F	GTAAAACGACGGCCAGTGTGCATTTGCGATGTTG	576
	M13_DEOD-R	GCGGATAACAATTTACACAGGTGSYGTGTTTGTTCGTG	
gdhA	M13_GDHA-F	GTAAAACGACGGCCAGTYTTAGTTGARCCTGAACG	513
	M13_GDHA-R	GCGGATAACAATTTACACAGGCTTGACCTTCAATYGTGC	
g6pd	M13_G6PD-F	GTAAAACGACGGCCAGTCHGGYGAYTMACTYATCG	651
	M13_G6PD-R	GCGGATAACAATTTACACAGGTTTBGCGATBARTTTRTCRGC	
Mdh	M13_MDH-F	GTAAAACGACGGCCAGTAAGTTGCWGTWYTAGGTG	552
	M13_MDH-R	GCGGATAACAATTTACACAGGCCTAATTCAATATCYGCACG	
Pgi	M13_PGI-F	GTAAAACGACGGCCAGTGCCWGTGYTKGTTGATGG	609
	M13_PGI-R	GCGGATAACAATTTACACAGGTTGKGCTGGCGCRATRAA	

Las reacciones de amplificación se preparaban en volúmenes de 25 µl conteniendo 12,5 µl de Taq PCR Máster MixTM (Taq DNA Polimerasa a 2,5 U, tampón de PCR, y dNTPs) que proporciona una concentración final de 1,5 mM de MgCl₂ y 200 µM de cada dNTP, 2 µl del primer directo (forward) a 25 pmol/µl., 2 µl del primer

inverso (reverse) a 25 pmol/μl., 6,5 μl de agua destilada gradiente PCR y 2 μl de muestra de ADN genómico de *P. multocida* (5-20 ng/ μl). Las secuencias de los cebadores para amplificar los siete genes conservados son las descritas en el esquema MLST Multi-host de *P. multocida* modificados (Tabla 3.5.). Se añadió en el extremo 5' la secuencia del primer universal M13 correspondiente (directo y reverso), para facilitar la secuenciación. Los cebadores se solicitaron a Sigma™.

Las PCR se llevaron a cabo en un termociclador MJ Mini™ Thermal Cycler PTC-1148 (Bio-Rad™), siguiendo las instrucciones del fabricante del kit de Taq polimerasa (Qiagen™) y utilizando los parámetros de amplificación publicados en la base de datos del esquema Multi-host (http://pubmlst.org/pmultocida_multihost/). Se llevó a cabo un ciclo inicial de desnaturalización inicial 94° C 3 minutos y treinta ciclos de desnaturalización a 94° C 45 segundos, alineamiento (*annealing*): 56° C 45 segundos y extensión: 72° C 2 minutos. Se realizó un ciclo final de extensión a 72° C 10 minutos y conservación a 4° C sin límite de tiempo.

Se confirmó la amplificación de los productos de PCR del tamaño esperado de *P. multocida* (Tabla 2.6.), mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Se utilizó 1 g de agarosa *Certified™ Molecular Biology Agarose* (Bio-Rad™), disuelto en 100 ml de tampón TBE 1X (Bio-Rad™), al que se añadieron 3 μl de SYBR® Safe disuelto en DMSO y concentrado 10,000X (Invitrogen™) como tinción fluorescente. Para la electroforesis se utilizó una cubeta *Wide Mini-Sub Cell GT Cell™* (Bio-Rad™) y una fuente de alimentación *PowerPac™ Basic Power Supply* (Bio-Rad™). La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 80 mV durante 60 min. Los tamaños esperados de banda para cada gen del esquema de MLST de *P. multocida*, figuran en la Tabla 2.6.

Los productos de PCR se purificaron utilizando un kit comercial (GENECLEAN® Turbo Kit, MP Biomedicals, España), y se secuenciaron en SECUGEN (Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, España) utilizando el kit de secuenciación DyeDeoxy (dRhodamine) Terminator Cycle Sequencing, en un secuenciador automático de ADN ABI Prism. La secuenciación de los genes se llevó a cabo en ambas direcciones usando el par de cebadores universales M13, directo (5'-GTAAAACGACGGCCAGT) y reverso (5'-GCGGATAACAATTTCACACAGG). La secuencia de cada locus se verificó en la base

de datos del sitio web MLST Multi-host para la asignación de alelos y ST de cada aislado.

“MULTILOCUS SEQUENCE TYPING” (MLST) RIRDC DE *P. multocida*

La base de datos Multi-host de *P. multocida* comprendía un número limitado de aislados procedentes de ganado ovino en el momento de realizar el estudio por lo que no había suficiente volumen de datos para comparar. Por tanto, se analizaron adicionalmente los aislados más representativas de los ST detectados por Multi-host, es decir, las que contaran con al menos dos aislados identificados, utilizando la base de datos RIRDC de *P. multocida*, de acuerdo con los protocolos de Subaaharan (Subaaharan *et al.*, 2010) (http://pubmlst.org/pmultocida_rirdc/).

La amplificación por PCR de los siete genes conservados propuestos en el esquema de MLST de la RIRDC (*adk*, *est*, *pmi*, *zwf*, *mdh*, *gdh* y *pgi*) se llevó a cabo usando cebadores (Tabla 3.6.) y protocolos disponibles en esta base de datos. Los productos de PCR se purificaron y secuenciaron según lo descrito anteriormente. Los alelos MLST y los ST resultantes se asignaron verificando las secuencias obtenidas a través de la base de datos RIRDC.

Tabla 3.6. Cebadores utilizados para la amplificación y secuenciación de los genes “housekeeping” en el esquema de MLST RIRDC de *P. multocida*.

Gen	Cebador	Secuencias (5' -> 3')	bp
adk	M13_adk-F	GTAAACGACGGCCAGT TTTTCGTCCCGTCTAAGC	570
	M13_adk-R	GCGGATAACAATTTACACAGGGGGAAAGGGACACAAGC	
est	M13_est-F	GTAAACGACGGCCAGTTCTGGCAAAAGATGTTGTCG	641
	M13_est-R	GCGGATAACAATTTACACAGGCCAAATTCTTGTTGGTTGG	
pmi	M13_pmi-F	GTAAACGACGGCCAGTTCCTTGAGACAGGGTAAGC	739
	M13_pmi-R	GCGGATAACAATTTACACAGGGCCTTAACAAGTCCCATTG	
zwf-1	M13_zwf-1-F	GTAAACGACGGCCAGTAATCGGTCGTTGACTGAGC	808
	M13_zwf-1-R	GCGGATAACAATTTACACAGGTGCTTCACCTCAACTGTGC	
zwf-2 *	M13_zwf-2-F	GTAAACGACGGCCAGTTGTTAGGTGTGGCAAGAACG	620
	M13_zwf-2-R	GCGGATAACAATTTACACAGGTTGCAACAATGGTTTGGGA	
mdh	M13_mdh-F	GTAAACGACGGCCAGTATTCGGGATCAGGGTTAGC	702
	M13_mdh-R	GCGGATAACAATTTACACAGGGGAAAACCGTAATGGAAGG	
gdh	M13_gdh-F	GTAAACGACGGCCAGTATCGACTTCTCCGAGACC	784
	M13_gdh-R	GCGGATAACAATTTACACAGGGCGGGTGATATTGGTGTAGG	
pgi	M13_pgi-F	GTAAACGACGGCCAGTACCACGCTATTTTGGTTGC	614
	M13_pgi-R	GCGGATAACAATTTACACAGGATGGCACAACTCTTTCACC	

* El par de cebadores (zwf-2) solo se utiliza si la pareja de cebadores (zwf-1) no puede amplificar el producto deseado.

ANÁLISIS DE DATOS

Para el análisis de los cromatogramas correspondientes a los resultados de secuenciación se utilizaron los programas CRHOMAS v.2.33. (Technelysium Pty. Ltd.) y Sequence Scanner Software v1.0 (Applied Biosystems®). Para el alineamiento posterior de las secuencias directa y reversa se utilizó CLUSTALX v.2.1. (The European Bioinformatics Institute).

Los STs identificados en este estudio y los disponibles en la base de datos de MLST correspondientes se analizaron usando el programa eBURST v3 (<http://eburst.mlst.net/>) para determinar la diversidad de la población y determinar los complejos clonales (CC). Los CC se definieron utilizando la definición más conservadora, en la que todos los miembros asignados al mismo complejo comparten alelos idénticos en, al menos, seis de los siete *loci* con los otros miembros del grupo. Además, a partir de las secuencias concatenadas de los siete *loci* de MLST, se realizó análisis filogenético de los aislados utilizando el programa de software MEGA (MEGA6 v6.0.6). Este software se usó para construir un árbol filogenético de tipo *neighbor-joining* con el parámetro de medida de distancia *Kimura-2*, aplicando 1000 repeticiones *bootstrap*. Los perfiles de PFGE y las relaciones genéticas entre los aislados se analizaron utilizando el programa BioNumerics (Applied Maths, Belgium).

La frecuencia y la asociación entre variables fueron analizadas utilizando el programa Epi Info™ 7 del Centro para el Control de Enfermedades (CDC) (<http://wwwn.cdc.gov/>). El análisis de asociación entre las variables categóricas se realizó mediante el test exacto de Fisher. El nivel de significación se estableció en $P < 0.05$. La diversidad genética (DG) se calculó como la relación entre el total de patrones de MLST o pulsotipos y el total de aislados (Martinez *et al.* 2002)

4. RESULTADOS



RESULTADOS DE LA TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE *M. haemolytica*

FRECUENCIA DE STs POR EL ESQUEMA MLST DE *M. haemolytica*

En los 121 aislados analizados se detectaron un total de 12 STs mediante el esquema MLST para *M. haemolytica* (Figura 4.1), lo que supone una DG de 0,1. Los STs detectados en este estudio han sido previamente descritos según los datos contenidos en la base de datos pública (<https://pubmlst.org/mhaemolytica/>). Los STs más frecuentes fueron ST16 (50/121; 41,3%), ST 28 (29/121; 24,0%) y ST8 (19/121; 15,7%). Los STs restantes incluyeron menos de diez aislados cada uno (Tabla 4.1).

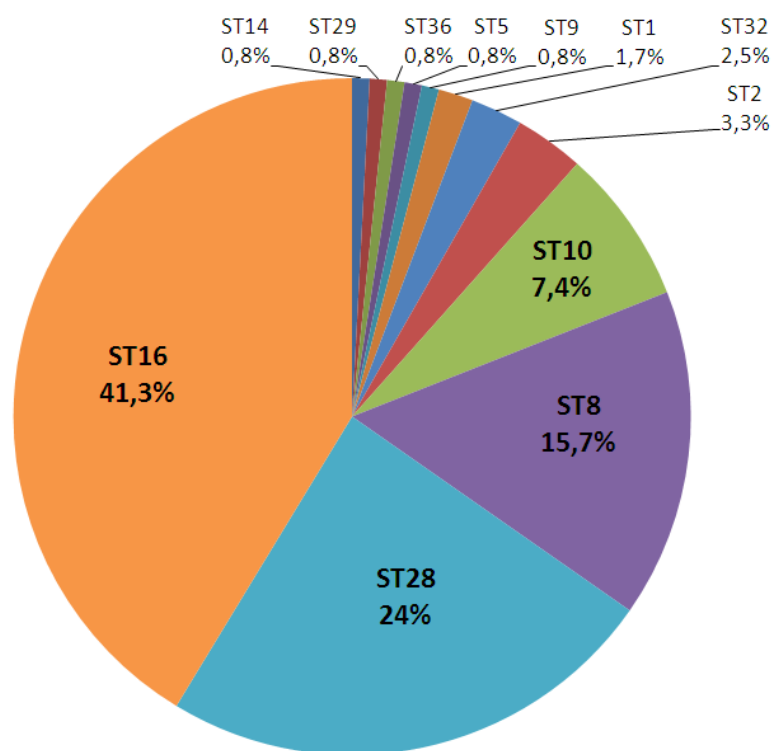


Figura 4.1. Frecuencias de ST entre aislados de *M. haemolytica* procedentes de pulmones con lesiones neumónicas y sin lesiones.

Todos los STs incluyeron aislados procedentes tanto de lesiones neumónicas como de pulmones sanos, excepto aquellas STs representadas por un único aislados (Tabla 4.1.). Los STs más frecuentes entre los aislados procedente de lesiones neumónicas fueron el ST16 (32 aislados; 42,7%), ST28 (16 aislados; 21,3%) y ST8 (13 aislados; 17,3%) incluyendo el 81,3% de estos aislados. Asimismo, los STs más frecuentes entre aislados procedentes de pulmones sin lesiones neumónicas fueron el ST16 (18 aislados; 39,1%), ST28 (13 aislados; 28,3%) y ST8 (seis aislados; 13,0%), lo que representa el 80,4% de estos aislados (Tabla 4.1). Las diferencias en las frecuencias de ST entre aislados de pulmones con y sin lesiones neumónicas no fueron estadísticamente significativas (Tabla 4.1, $P > 0.05$).

Los ST detectados en este estudio se compararon con los disponibles en la base de datos MLST de *M. haemolytica* (<https://pubmlst.org/mhaemolytica/>) mediante análisis e-BURST (Figura 4.2). Sesenta y seis de los 121 aislados de *M. hemolytica* (54,5%) se agruparon en tres complejos clonales o CC (Fig. 4.2). El CC28 comprendía 31 aislados (25,6%) pertenecientes al ST28 y al ST1, el CC8 comprendía 29 aislados (24,0%) del ST8, el ST10 y el ST14, y el CC4 comprendía seis aislados (5,0%) del ST2, el ST36 y el ST9. Además, el 41,0% de los aislados (50/121) pertenecieron al *singleton* ST16.

La estructura poblacional observada mediante e-BURST se mantuvo al realizar un análisis mediante *neighbor-joining* a partir de las secuencias concatenadas de los siete *loci* del esquema MLST. La mayoría de los aislados se agruparon en dos grupos genéticos (Gg1 y Gg2, Figura 4.3). El Gg1 comprendía el 66,9% de los aislados (81/121), y el Gg2 comprendía 28,1% de los aislados (34/121).

Tabla 4.1. Frecuencias de ST entre aislados de *M. haemolytica* procedentes de pulmones con lesiones neumónicas y sin lesiones neumónicas.

Tipo de Secuencia (ST)	Aislados totales		Procedencia de los aislados de <i>M. haemolytica</i>				OR (IC 95%)
			Lesiones neumónicas		Pulmones sin lesiones		
	n	%	n	%	n	%	
ST16	50	41,3	32	42,7	18	39,1	1,2 (0,5-2,4)
ST28	29	24,0	16	21,3	13	28,3	0,7 (0,3-1,6)
ST8	19	15,7	13	17,3	6	13,0	1,4 (0,4-3,4)
ST10	9	7,4	6	8,0	3	6,5	1,2 (0,3-5,2)
ST2	4	3,3	3	4,0	1	2,2	1,9 (0,2-18,6)
ST32	3	2,5	2	2,7	1	2,2	1,2 (0,1-14,0)
ST1	2	1,7	1	1,3	1	2,2	0,6 (0,1-10,0)
ST5	1	0,8	1	1,3	0	0,0	NA
ST9	1	0,8	0	0,0	1	2,2	NA
ST14	1	0,8	0	0,0	1	2,2	NA
ST29	1	0,8	0	0,0	1	2,2	NA
ST36	1	0,8	1	1,3	0	0,0	NA
Total	121	100,0	75	100,0	46	100,0	

NA: no aplicable; OR: odds ratio; IC: intervalo de confianza

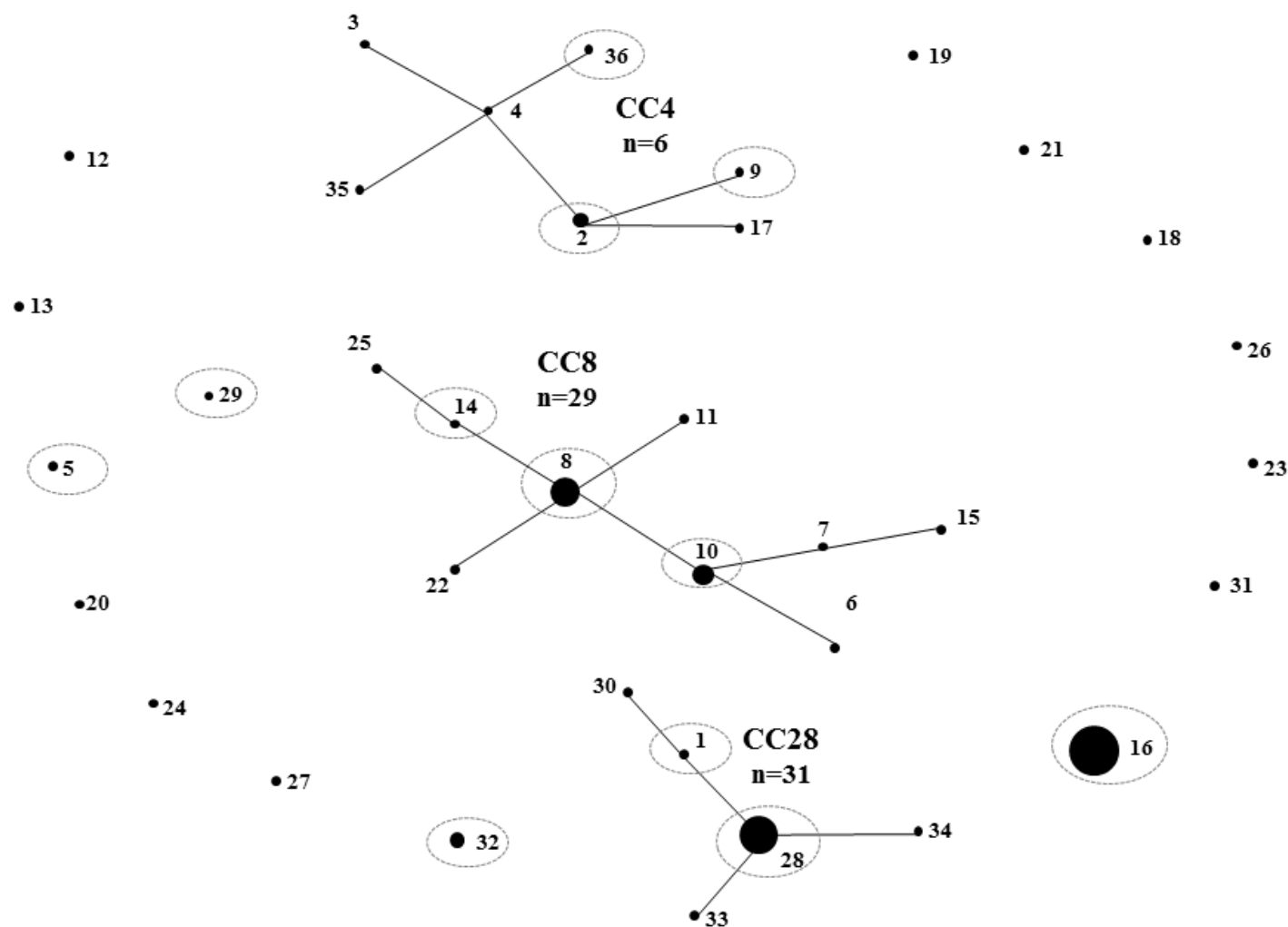


Figura 4.2. Análisis e-BURST de los STs de la base de datos de MLST de *M. haemolytica*.

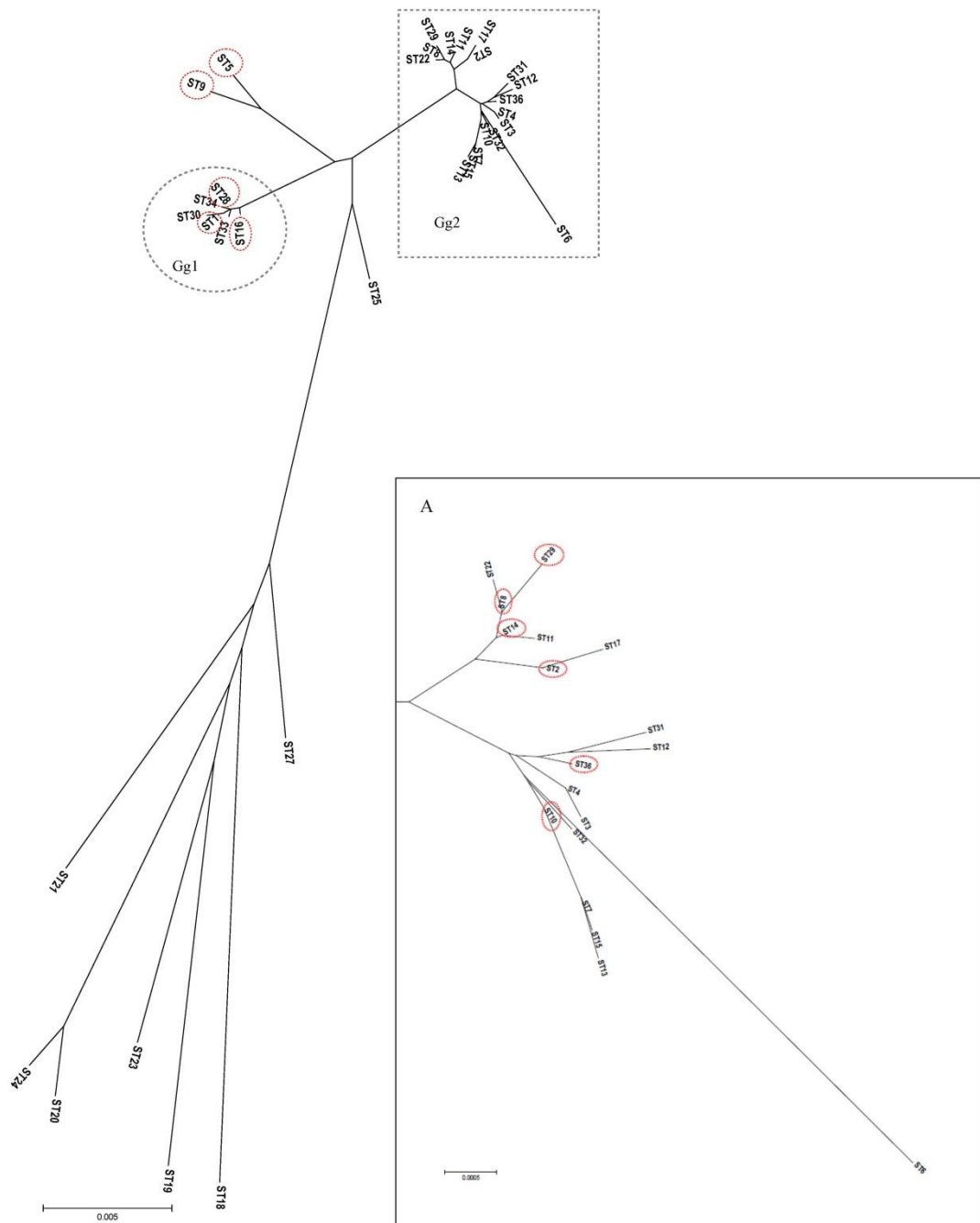


Figura 4.3. Árbol filogenético basado en el método *neighbor-joining* de secuencias concatenadas de ST incluidas en la base de datos MLST de *M. haemolytica*. Los ST detectados en este estudio están etiquetados en color rojo. Grupos genéticos (Gg) agrupados en línea gris discontinua. A. Ampliación del grupo genético Gg2.

PATRONES DE RESTRICCIÓN MEDIANTE PFGE (PULSOTIPOS)

En el análisis mediante PFGE se obtuvo el perfil de restricción de 110 de los aislados analizados, puesto que 11 no dieron resultados útiles tras dos repeticiones o no crecieron las cepas para poder ser analizadas.

Los 110 aislados mostraron 63 pulsotipos diferentes (Figura 4.4), lo que indica una DG de 0,57. Los aislados procedentes de pulmones con y sin lesiones neumónicas exhibieron una DG similar. Los 69 aislados procedentes de pulmones con lesiones neumónicas generaron 48 perfiles PFGE, y los 41 aislados procedentes de pulmones sin lesiones neumónicas generaron 27 perfiles PFGE, lo que implica una DG de 0,69 y 0,66, respectivamente ($P > 0,05$). De los 63 pulsotipos, 36 (57,1%) incluyeron un único aislado mientras que 27 (42,9%) incluyeron más de un aislado (de dos a seis aislados). De estos 27, 12 (44,4%) pulsotipos incluyeron aislados procedentes de pulmones con y sin lesión (figura 4.4).

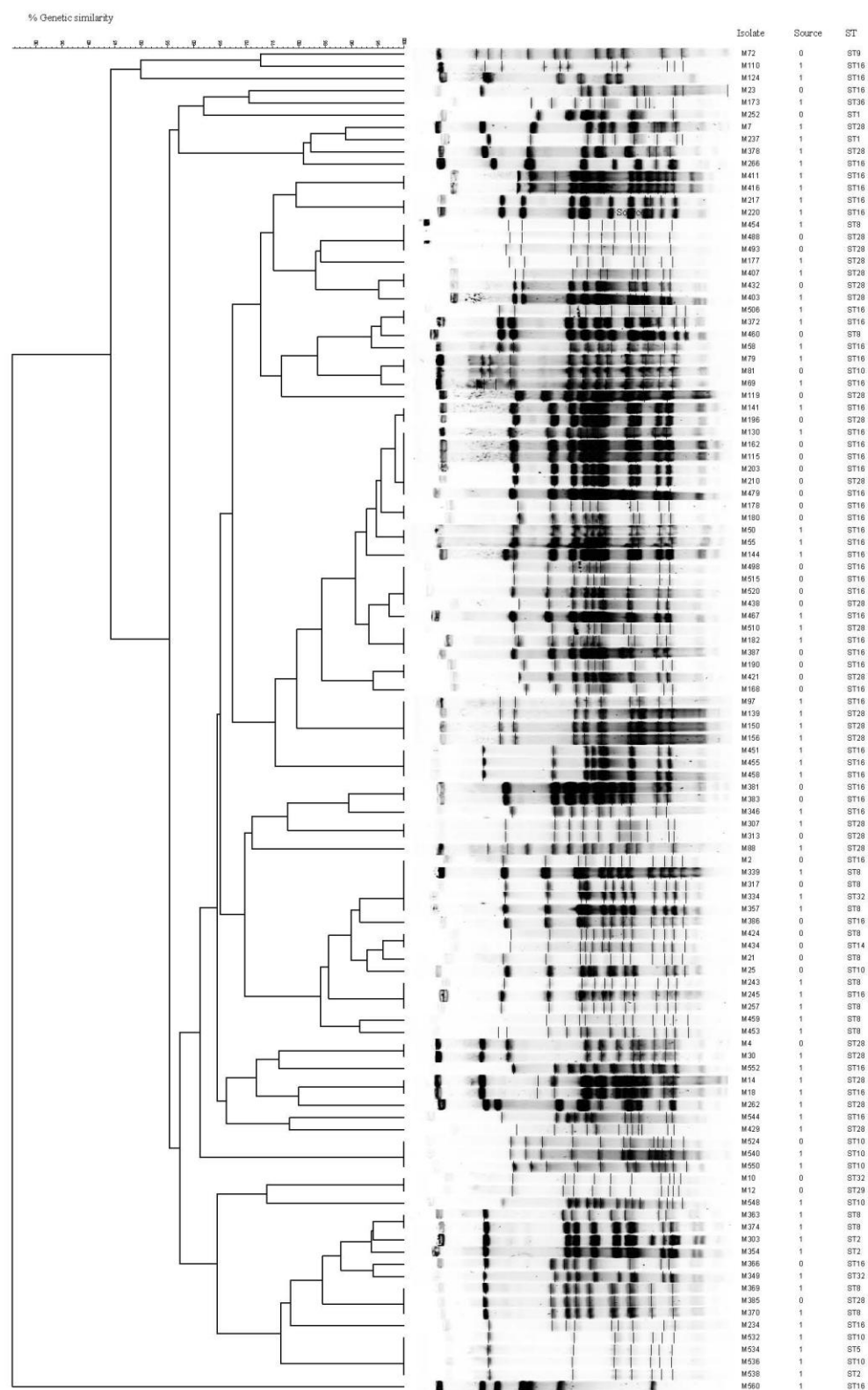


Figura 4.4. Dendrograma mostrando las relaciones genéticas entre los pulsotipos de *M. haemolytica* identificados por PFGE. Origen (source): 1, lesiones neumónicas; 0, pulmones sin lesión neumónica.

PERFILES DE VIRULENCIA

En la Tabla 4.2. se muestran los 5 perfiles de virulencia mayoritarios (Tabla 4.2.). Estos 5 perfiles incluyen el 64% y el 65,2% de los aislados de *M. haemolytica* recuperados de pulmones con y sin lesiones neumónicas, respectivamente. No se detectaron diferencias significativas entre los perfiles de virulencia de los aislados procedentes de lesiones neumónicas y los procedentes de pulmones sin lesiones, excepto el perfil 1 que fue significativamente más frecuente en los aislados no neumónicos.

En la Tabla 4.3. se muestra la relación de los STs detectados con los perfiles de virulencia mayoritarios en los aislados de *M. haemolytica*. En los STs mayoritarios, ST16, ST28 y ST8, se detectaron varios perfiles de virulencia aunque alguno de ellos fue significativamente más frecuente (Tabla 4.3.).

Tabla 4.2. Principales perfiles de genes asociados a virulencia (VPs) de los aislados de *M. haemolytica* examinados en el presente estudio.

VPs	Genes asociados a virulencia ^a						Nº (%) de aislados procedentes de		OR (IC 95%) ^b
	<i>irp</i>	<i>gcp</i>	<i>sodC</i>	<i>hf</i>	<i>lpsA</i>	<i>nanH</i>	Lesiones neumónicas (n=75)	Pulmones sin lesiones neumónicas (n=46)	
1	-	+	-	+	+	+	15 (20, %)	18 (39,1%)	0,4 (0,2-0,9)
2	+	+	-	+	+	+	14 (18,8%)	4 (8,7%)	2,3 (0,7-7,5)
3	+	+	-	-	+	+	7 (9,3%)	2 (4,3%)	2,3 (0,5-11,4)
4	+	+	+	+	-	+	5 (6,7%)	4 (8,7%)	0,8 (0,2-2,9)
5	+	-	-	+	-	+	7 (9,3%)	2 (4,3%)	2,3 (0,5-11,4)

^a Además de a los genes *lktA*, *tbpA*, *tbpB* y *tonB*, todos los aislados de *M. haemolytica* de los VP I-V también fueron positivos para los genes *sodA*, *pomA*, *plpD*, *pilA*, *adh* y *fhaC*.

^b OR: odds ratio, IC: Intervalo de confianza.

Tabla 4.3. Número de aislados correspondientes a cada ST relacionados con los perfiles de virulencia.

ST	Perfiles de virulencia					TOTAL
	1	2	3	4	5	
ST16	26*	5	6	1	2	40
ST28	6	13*	1	0	0	20
ST8	0	0	0	7*	4	11
ST2	0	0	0	0	2	2
ST10	0	0	2	0	0	2
ST32	0	0	0	1	1	2
ST36	1	0	0	0	0	1
TOTAL	33	18	9	9	9	78

*Relación estadísticamente significativa ($P < 0,05$)

RESULTADOS DE LA TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE *P. multocida*

FRECUENCIA DE STs POR EL SISTEMA MLST MULTI-HOST

En los 43 aislados analizados se detectaron un total de 16 STs por el esquema MLST Multi-host, lo que supone una diversidad genética (DG) de 0,37. De los 16 STs descritos, 13 se describieron por primera vez en este estudio (ST48, ST49, ST50, ST51, ST52, ST53, ST54, ST55, ST56, ST57, ST58, ST59 y ST60) mientras que los STs ST19, ST20 y ST29 habían sido detectados previamente en la base de datos pública del sistema MLST Multi-host (http://pubmlst.org/pmultocida_multihost/).

Los ST hallados con mayor frecuencia fueron el ST50 (12/43; 27,9%) y el ST19 (11/43; 25,6%), que engloban el 53,5% de los aislados (figura 4.5). Además, se detectaron el ST56 (4/43; 9,3%), el ST20 (3/43; 7%), el ST52 (2/43; 4,7%) y los STs ST29, ST48, ST49, ST51, ST53, ST54, ST55, ST57, ST58, ST59 y ST60, que estuvieron representados por un único aislado (1/43; 2,3%).

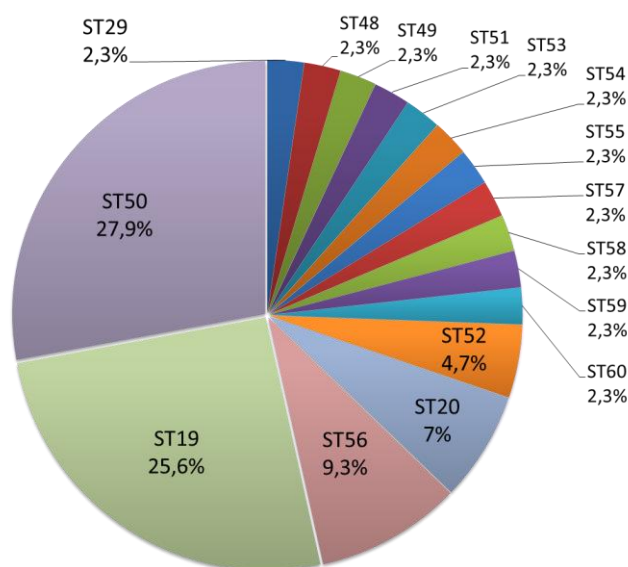


Figura 4.5. Frecuencia de STs en los aislados por el sistema MLST Multi-host de *P. multocida*.

Los ST detectados en este estudio y los STs disponibles en la base de datos de MLST Multi-host de *P. multocida* (http://pubmlst.org/pmultocida_multihost/) se analizaron mediante e-BURST. La mayoría de los aislados (41/43) se agruparon en dos grupos genéticos (GgOv1 y GgOv2, Fig. 4.2). El GgOv1 (26 aislados) incluyó el ST19 (11 aislados) y nueve STs con menos de cinco aislados cada uno (ST20, ST52, ST53, ST55, ST56, ST57, ST58, ST59 y ST60). El GgOv2 (15 aislados) incluyó el ST50 (12 aislados) y tres ST adicionales (ST48, ST49 y ST54) representados por un aislado cada uno (figura 4.6).

En el análisis filogenético mediante el método *neighbor-joining* de las secuencias concatenadas de los 7 genes de los STs de la base de datos, se detectaron dos grupos genéticos (figura 4.7) al igual que en el análisis e-BURST. El grupo 1 (GgOv1) contenía 26 aislados incluyendo los del ST19 (11 aislados), ST56 (4 aislados), ST20 (3 aislados), ST52 (2 aislados), ST53, ST55, ST57, ST58, ST59 y ST 60 (1 aislado cada uno). En el grupo 2 (GgOv2) se detectaron 15 aislados, incluyendo los del ST50 (12 aislados), ST 48, ST49 y ST54 (1 aislado cada uno).

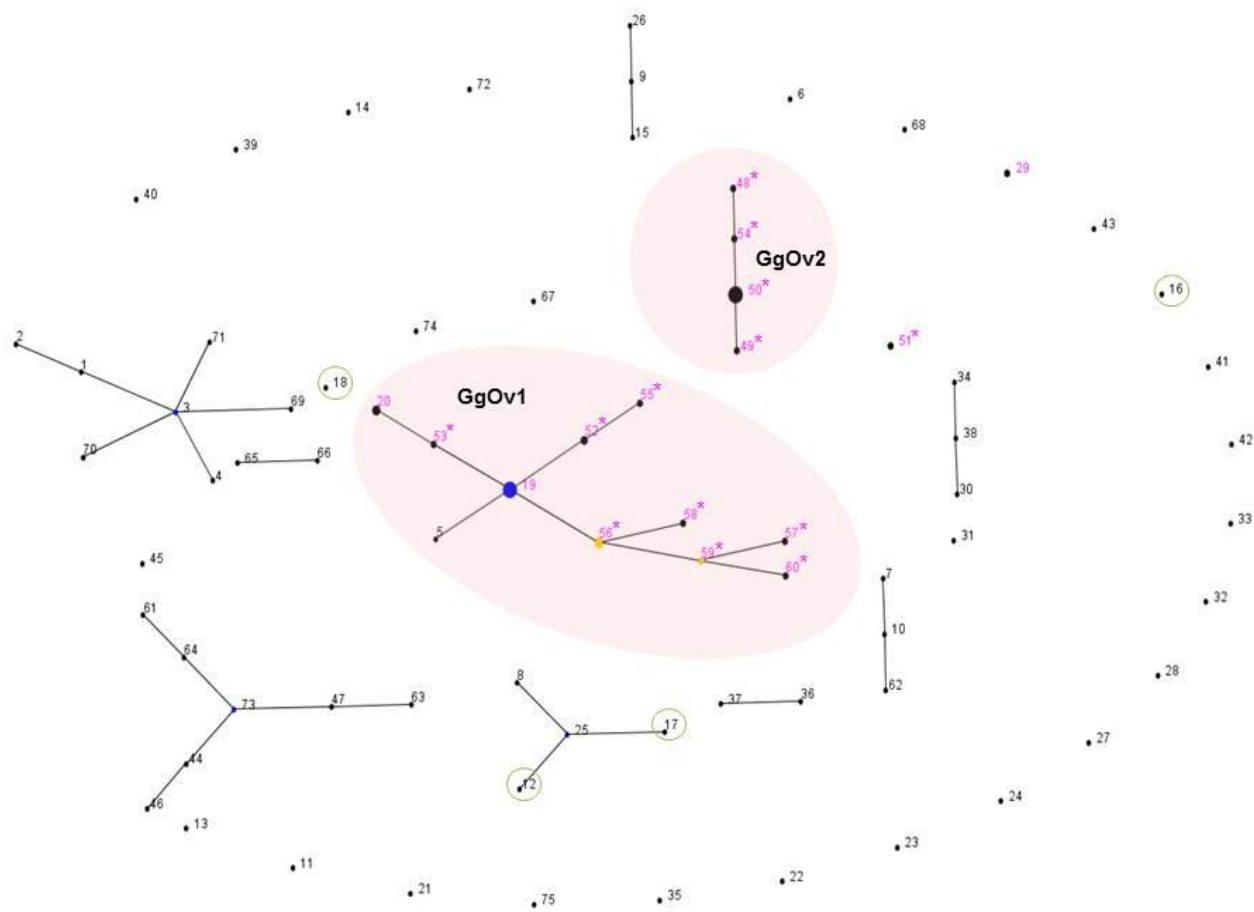


Figura 4.6. Análisis e-BURST de los STs de la bases de datos de MLST Multi-host de *P. multocida*.

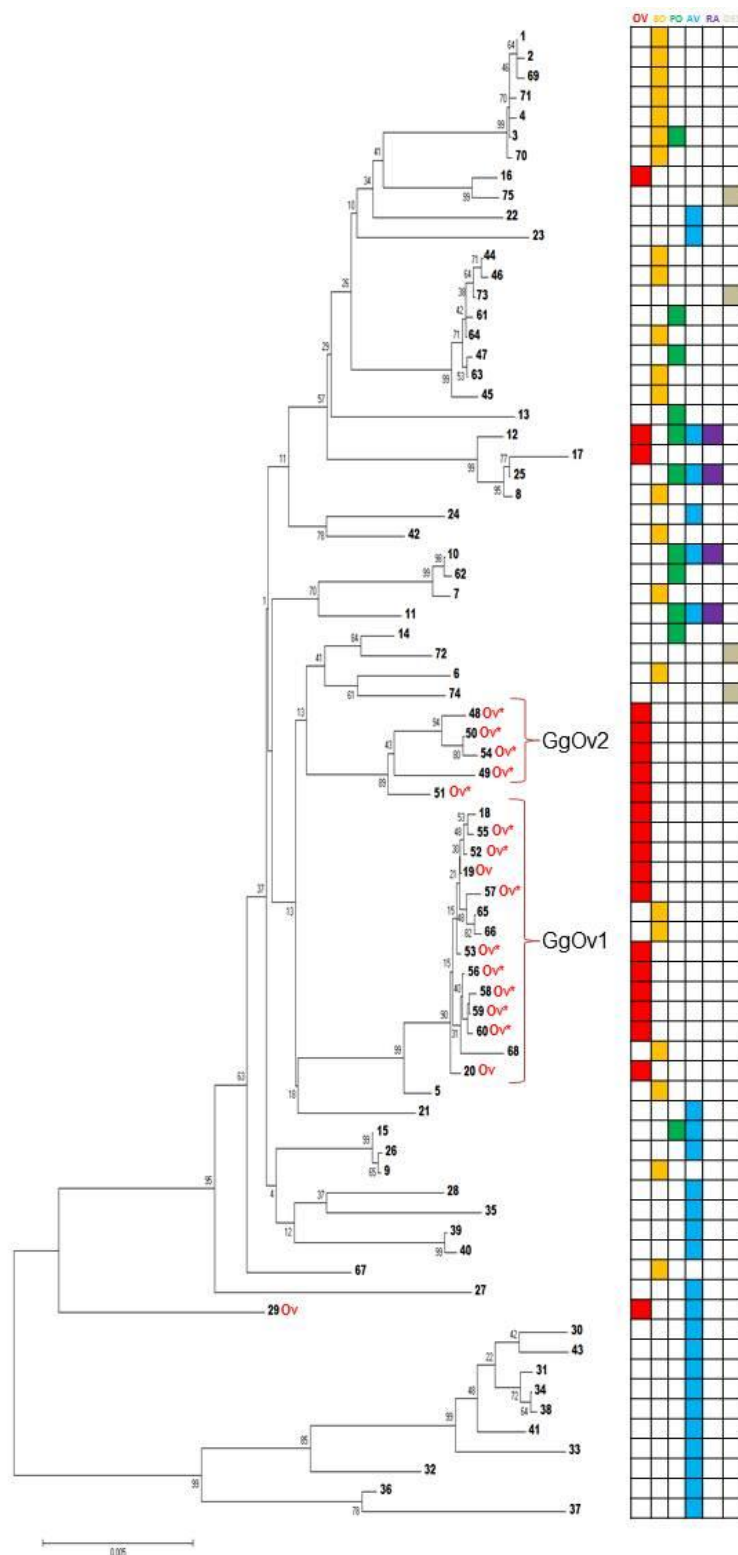


Figura 4.7. Árbol filogenético basado en el método neighbor-joining de secuencias concatenadas de ST incluidas en la base de datos MLST Multi-host de *P. multocida*. Hospedadores: Ov, ovino; Bo, bovino; Po, porcino; Av, aves; Ra, conejo. STs detectados en este estudio: Ov en rojo, * nuevos ST. GgOv, grupo genético de aislados ovinos.

COMPARACIÓN CON STs DE OTRAS ESPECIES

Los dos grupos genéticos detectados en este estudio GgOv1 y GgOv2 incluían exclusivamente STs detectadas en rumiantes, mayoritariamente ovino, según la base de datos pública del MLST Multi-host (Fig. 4.7). Estos resultados se compararon con los obtenidos en un estudio realizado en porcino (García-Alvarez *et al.*, 2017). A diferencia del ovino, los STs mayoritarios en porcino (ST3, ST10, ST11, ST12 y ST25) están presentes en múltiples hospedadores (Fig. 4.7).

STs SEGÚN MLST RIRDC DE *P. multocida*

Para comprobar si esta asociación de estas STs con ovino se debía al limitado número de aislados de esta especie presentes en la base de datos Multi-host, se tipificó una selección de aislados mediante el esquema MLST RIRDC de *P. multocida* cuya base de datos contenía mayor número de aislados de ovino en el momento de realizar este estudio. Para ello, se seleccionaron 12 aislados representativos de aquellos ST más frecuentes por el esquema MLST Multi-host (con al menos dos aislados identificados).

Se identificaron siete STs (Tabla 4.4.). Los ST95_{RIRDC}, ST131_{RIRDC} y ST203_{RIRDC} han sido detectados previamente en neumonía de ovino y un aislado de caprino, mientras que los ST320_{RIRDC}, ST324_{RIRDC}, ST321_{RIRDC} y ST323_{RIRDC} fueron identificados en este estudio como nuevos ST (Tabla 4.4.). Por tanto, todos los STs detectados en ovino en este estudio han sido detectados exclusivamente en rumiantes, y más concretamente en pequeños rumiantes, por el sistema RIRDC.

TIPO CAPSULAR, PERFILES DE VIRULENCIA Y RELACIÓN CON STs (MULTI-HOST)

El 58,1% de los aislados ovinos pertenecía al tipo capsular A, el 37,2% al tipo capsular D y dos de los aislados no amplificaron por PCR para ninguno de los cinco tipos capsulares analizados (CAP-) (Tabla 4.5.). Los tipos capsulares B, E o F no se detectaron en ninguno de los aislados.

Tabla 4.4. Distribución de STs identificados mediante el esquema MLST RIRDC de *P. multocida*.

ST RIRDC ^a	Nº de aislados en este estudio	ST Multi-Host (no. de aislados)	Aislados en la base de datos RIRDC			
			No. de aislados ^b	Hospedador	Enfermedad	País
ST95 _{RIRDC}	2	ST20	4	Ovino	Neumonía	España
ST131 _{RIRDC}	1	ST19	3	Ovino	Neumonía	N. Zelanda, España (este estudio)
ST203 _{RIRDC}	1	ST50	2	Caprino, ovino	Desconocido, neumonía	Desconocido, España (este estudio)
<u>ST321</u> _{RIRDC}	1	ST50	1	Ovino	Neumonía	España (este estudio)
<u>ST323</u> _{RIRDC}	1	ST50	1	Ovino	Neumonía	España (este estudio)
<u>ST320</u> _{RIRDC}	2	ST19, ST52	2	Ovino	Neumonía	España (este estudio)
<u>ST324</u> _{RIRDC}	4	ST19, ST52, ST56 (2)	4	Ovino	Neumonía	España (este estudio)

^a Los STs subrayados son STs nuevos identificados en este estudio.

^b Aislados de cada ST incluidos previamente en la base de datos RIRDC en el momento este estudio más aislados caracterizados en el mismo

Tabla 4.5. Distribución del tipo capsular, STs (Multi-host) y perfiles de genes asociados a la virulencia con respecto a la presencia enfermedad en aislados de *P. multocida*.

	Número de aislados de <i>P. multocida</i> (%)						Total (n=43)
	ST19 (n=11)	ST50 (n=12)	ST56 (n=4)	ST20 (n=3)	ST52 (n=2)	Otros ^a (n=11)	
Lesión neumónica							
Sí	10 (28,6)	7 (20,0)	4 (11,4)	3 (8,6)	2 (5,7)	9 (25,7)	35 (100)
No	1 (12,5)	5 (62,5)	0	0	0	2 (25,7)	8 (100)
Tipo capsular							
A	2 (8,0)	11 (44,0) ^c	4 (16,0)	0	0	8 (32,0)	25 (100)
B	0	0	0	0	0	0	0
D	9 (56,3) ^c	1 (6,3)		3 (18,8)	1 (6,3)	2 (12,5)	16 (100)
F	0	0	0	0	0	0	0
CAP-	0	0	0	0	1 (50,0)	1 (50,0)	2 (100)
Perfil VAG^b							
<i>tbpA</i>+	4 (48,9)	2 (24,4)	0	2 (24,4)	1 (12,2)	0	9 (100)
<i>tbpA</i>+/<i>toxA</i>+	6 (20,0)	10 (33,3)	3 (10,0)	1 (3,3)	1 (3,3)	9 (30,0)	30 (100)
<i>tbpA</i>+/<i>toxA</i>+/<i>pfhA</i>+	0	0	1 (50,0)	0	0	1 (50,0)	2 (100)
<i>tbpA</i>+/<i>pfhA</i>+	1 (100,0)	0	0	0	0	0	1 (100)
<i>hgbB</i>+/<i>pfhA</i>+	0	0	0	0	0	1 (100)	1 (100)

^a 11 STs diferentes: ST29, ST48, ST49, ST51, ST53, ST54, ST55, ST57, ST58, ST59, ST60 (un solo aislado de cada ST).

^b VAG: genes asociados a la virulencia.

^c Estadísticamente significativo (P < 0,05).

El tipo capsular A se asoció de manera estadísticamente significativa ($P < 0,05$) al ST50 con 11 aislados de tipo capsular A pertenecientes a dicho ST (44,0%). Asimismo, el tipo capsular D se asoció de manera estadísticamente significativa ($P < 0,05$) al ST19, con 9 aislados de tipo capsular D pertenecientes a este ST (56,3%).

Todos los aislados excepto uno presentaron el gen *tbpA* y el 74,4 % (32/43) fueron positivos al gen *toxA*, mientras que el gen *pfhA* se detectó en 4 de los aislados y el gen *hgbB* en un único aislado (Tabla 4.5.). En función de la presencia o ausencia de los genes asociados a virulencia analizados en este estudio, los aislados se clasificaron en cinco perfiles de virulencia distintos (Tabla 4.5.). El perfil VAG identificado con mayor frecuencia fue el *tbpA*+/*toxA*+ (30/43; 69,8%). Este perfil de virulencia se asoció de manera significativa al tipo capsular A ($P < 0,05$). Este perfil genético de virulencia (*tbpA*+/*toxA*+) estuvo distribuido en todos los STs detectados en este estudio, excepto en dos STs representados por un único aislado (Tabla 4.1.). El segundo perfil más frecuente fue el *tbpA*+ representado por el 20,9 % (9/43), también distribuido en varios STs (tabla 4.5.).

PRODUCCIÓN DE LA TOXINA DE *P. multocida* (PMT)

En la tabla 4.6. se muestran los resultados de la detección de PMT mediante ELISA. La presencia del antígeno se detectó en el 93,1 % de los aislados *toxA* positivos. Tan solo 4 de los aislados dieron resultado negativo después de dos ensayos. La producción de toxina se detectó en aislados de todos los STs analizados.

Tabla 4.6. Detección de toxina PMT mediante Kit PMT de Dako™ en aislados positivos por PCR al gen toxA y ST de los aislados analizados por MLST.

<i>P. multocida</i>	DO 450 nm	PMT	ST	<i>P. multocida</i>	DO 450 nm	PMT	ST	<i>P. multocida</i>	DO 450 nm	PMT	ST
M66	1,987	+	ST48	M206	1,037	+	NA	P71	2,241	+	NA
M67	2,453	+	ST19	M208	0,75	+	ST50	P72	2,824	+	ST56
M77	2,206	+	ST49	M279	1,615	+	NA	P73	1,555	+	NA
M78	2,205	+	NA	M285	2,375	+	NA	P74	2,33	+	NA
M84	2,322	+	NA	M293	1,997	+	NA	P75	2,456	+	ST57
M93	2,055	+	NA	M297	2,796	+	ST19	P76	1,385	+	ST56
M96	1,704	+	ST19	M321	1,608	+	ST50	P77	1,738	+	ST52
M113	1,996	+	ST50	M326	1,3	+	ST50	P78	2,286	+	NA
M114	2,195	+	NA	M337	1,816	+	ST19	P79	2,266	+	NA
M117	1,507	+	NA	M343	1,565	+	ST19	P80	1,221	+	ST58
M128	0,105	-	NA	M344	0,808	+	ST53	P81	2,198	+	NA
M134	0,845	+	NA	P60	0,086	-	ST20	P82	1,842	+	NA

<i>P. multocida</i>	DO 450 nm	PMT	ST	<i>P. multocida</i>	DO 450 nm	PMT	ST	<i>P. multocida</i>	DO 450 nm	PMT	ST
M135	0,587	+	ST50	P61	1,87	+	ST50	P83	1,333	+	ST56
M160	2,461	+	ST50	P63	2,31	+	ST54	P84	0,972	+	ST59
M166	1,748	+	ST50	P64	2,807	+	NA	P85	2,396	+	ST60
M174	1,305	+	ST51	P65	2,322	+	ST55	P86	1,059	+	NA
M176	1,523	+	NA	P67	1,878	+	ST19	P87	1,633	+	NA
M187	2,256	+	NA	P68	1,987	+	ST56	P88	1,488	+	NA
M193	2,383	+	NA	P69	0,077	-	ST20				
M199	1,13	+	NA	P70	0,079	-	ST19				

NA: no analizado

5. DISCUSIÓN



El ganado ovino es una de las especies ganaderas de producción más importantes en todo el mundo. El ovino aporta el 4,5% de la carne producida a nivel mundial (FAO, 2016). Además de la carne genera otros productos como la leche, la lana y el cuero. Contribuyen a la seguridad alimentaria y desarrollo de las poblaciones rurales más desfavorecidas en muchas regiones del mundo. En Europa juegan un papel esencial en la protección del medio ambiente, el mantenimiento de la biodiversidad y la cohesión del medio rural. España es el segundo país productor de ovino de la Unión Europea después del Reino Unido (Eurostat, 2017).

La pasteurelisis neumónica es una de las enfermedades que tiene mayor impacto económico en los ovinos y caprinos domésticos en todo el mundo y una de las más importantes enfermedades en la etapa neonatal. *M. haemolytica* es el principal agente etiológico de la pasteurelisis de los terneros y ha sido ampliamente estudiado debido al gran impacto económico de esta enfermedad en la producción de carne de bovino, sobre todo en EEUU (Griffin, 1997; De Alwis, 1999; Faber *et al.*, 2000; Rice *et al.*, 2007; Mohamed y Abdelsalam, 2008; Stanton *et al.*, 2010; Constable *et al.*, 2016). *M. haemolytica* también se considera el principal agente etiológico de la pasteurelisis neumónica en ovinos (Donachie, 2007). *P. multocida* se consideraba que tiene una participación menor (Donachie, 2007). Sin embargo, varios estudios indican que la participación de *P. multocida* puede ser mayor de la considerada (Blackall *et al.*, 1995; Watson y Davies, 2002; Odugbo *et al.*, 2006; Rad *et al.*, 2011). En un estudio anterior realizado en la UCM en el que se analizaron pulmones de corderos sacrificados en matadero, con y sin lesiones neumónicas, se detectó una alta frecuencia de la infección con *P. multocida* y que las lesiones neumónicas se asocian a la infección por *M. haemolytica* y *P. multocida*, tanto en infección mixta como simple (Pinto, 2011).

M. haemolytica y *P. multocida* son ambas habitantes normales de la nasofaringe de los rumiantes. Se han descrito numerosos factores asociados a la virulencia en ambas especies (Adlam *et al.*, 1984; Brogden *et al.*, 1989; Davies y Donachie, 1996; Suckow, 2000; Highlander, 2001; Ewers *et al.*, 2006; Adamu, 2007; Boyce *et al.*, 2010). Sin embargo, estos factores están ampliamente difundidos en las poblaciones bacterianas y su presencia o ausencia no permite distinguir las posibles

cepas comensales de las patógenas, si es que existiesen diferencias. En este estudio se ha profundizado en la caracterización genética de los aislados de *M. haemolytica* y *P. multocida* asociados a las lesiones neumónicas de ovino utilizando técnicas de tipificación molecular como el MLST, PFGE y los perfiles de virulencia (“*virulotyping*”) con la finalidad de comparar los genotipos de los aislados procedentes de lesiones neumónicas de los corderos con los procedentes de lesiones no neumónicas.

Mannheimia haemolytica

Este es el primer estudio que compara las características genéticas de aislados de *M. haemolytica* procedentes lesiones neumónicas con aislados recuperados de pulmones sin lesiones mediante el análisis de PFGE y MLST. Además, los aislados de *M. haemolytica* también se analizaron mediante perfiles de genes asociados a la virulencia (“*virulotyping*”). Esta técnica es una herramienta útil para la caracterización molecular de patógenos bacterianos con fines epidemiológicos (Nowrouzian *et al.*, 2013; Schierack *et al.*, 2013; Furian *et al.*, 2016; Sánchez del Rey *et al.*, 2016; García-Alvarez *et al.*, 2017).

Los rumiantes sanos albergan *M. haemolytica* en su tracto respiratorio inferior de manera habitual (Angen *et al.*, 2009). Generalmente se acepta que las cepas de *M. haemolytica* que llegan a pulmón descienden desde el tracto respiratorio superior, que es su reservorio natural (Timsit *et al.*, 2013). *M. haemolytica* prolifera rápidamente en el tracto respiratorio superior como resultado de diferentes condiciones estresantes o coinfecciones, y las gotas de aerosol que contienen este patógeno se inhalan en los pulmones y son responsables de las infecciones bronconeumónicas (Singh *et al.*, 2011). No obstante, al igual que en otros patógenos respiratorios como *P. multocida*, la cuestión de si *M. haemolytica* es un patógeno verdadero u oportunista aún no se ha dilucidado por completo. Los estudios que investigan la dinámica de transmisión de *M. haemolytica* han prestado especial atención a la comparación de los aislados de *M. haemolytica* del tracto respiratorio superior e inferior (Timsit *et al.*, 2013; Klima *et al.*, 2014). Sin embargo, las muestras de *M. haemolytica* recuperadas del tracto respiratorio superior no siempre son representativas de aislados presentes en las lesiones neumónicas (Timsit *et al.*, 2013). En nuestro estudio, los aislados recuperados de pulmones de oveja sin

lesiones neumónicas se consideraron representativos de la parte de la población comensal de *M. haemolytica* presente en el tracto respiratorio superior capaz de alcanzar los pulmones.

Los aislados de *M. haemolytica* pertenecieron a 12 STs. Los ST16, ST28 y ST8 incluyeron el 80,3% de los aislados de ovino (Tabla 4.2). En la base de datos MLST de *M. haemolytica* (<https://pubmlst.org/mhaemolytica/>), estos tres ST representan el 27% de los aislados de oveja, y el ST16 y ST8 representan casi un tercio de los aislados de cabra incluidos en esta base de datos. Estos datos que indican una amplia distribución de estos genotipos en pequeños rumiantes. Además, ST16, ST28 y ST8 no se han identificado en aislados bovinos según los la base de datos pública de MLST de *M. haemolytica*. La detección de estas ST únicamente de ovejas y cabras sugiere la adaptación de ciertas líneas genéticas de *M. haemolytica* a pequeños rumiantes, como se observó para *P. multocida* (García-Alvarez *et al.*, 2017).

Después del análisis e-BURST, la mayoría de los aislados de oveja agrupados en complejos clonales CC2, CC8 y CC28 o pertenecían al singleton ST16 (Figura 4.2), un resultado consistente con la estructura de población clonal de *M. haemolytica* observada con diferentes métodos de tipificación (Davies *et al.*, 1997; Petersen *et al.*, 2009). Esta estructura clonal se mantuvo generalmente después del análisis filogenético *neighbor-joining* de las secuencias concatenadas de los siete *loci* MLST de *M. haemolytica*, con la mayoría de los aislados agrupados en dos grupos genéticos (Gg1 y Gg2, Fig. 2). En el análisis de campo pulsado (PFGE) el 65,3% de los aislados mostraron una relación genética mayor o igual al 80% (Figura 4.4). Estos datos también indicarían una estructura clonal de *M. haemolytica*. A pesar de esta estructura clonal, los 65 diferentes pulsotipos identificados (Figura 4.4) indican una diversidad genética importante (DG 0,57) entre los aislamientos de *M. haemolytica*. Niveles de diversidad genética similares han sido detectados previamente para *M. haemolytica* (Klima *et al.*, 2011; Timsit *et al.*, 2013; Rainbolt *et al.*, 2016). Los aislados de *M. haemolytica* procedentes de pulmones con y sin lesiones neumónicas mostraron niveles similares de diversidad genética (DG 0,69 y DG 0,66, respectivamente, $P > 0,05$). Estos resultados concuerdan con la diversidad genética similar observada entre aislados de *M. haemolytica* procedentes de procesos clínicos

y los procedentes de la nasofaringe (Mosier, 1997; Ackermann y Brogden, 2000; Klima *et al.*, 2011; Timsit *et al.*, 2013; Rainbolt *et al.*, 2016).

La diversidad genética confirmarían la hipótesis generalmente aceptada de que los casos individuales de neumonía en los ovinos se deben a cepas de *M. haemolytica* comensales del tracto respiratorio superior que descienden al pulmón debido a la actuación de factores estresantes que alteran las defensas del hospedador (Mosier, 1997; Ackermann y Brogden, 2000; Klima *et al.*, 2011; Timsit *et al.*, 2013; Rainbolt *et al.*, 2016). El grado de diversidad genética observado en los pulmones con lesiones también podría estar relacionado con el hecho de que los aislados de este estudio proceden de casos individuales de neumonía hallados en matadero. En cualquier caso, la gran diversidad genética identificada en los aislados de *M. haemolytica* procedentes de lesiones neumónicas indica que son múltiples las cepas que pueden producir la lesión en los corderos.

Pasteurella multocida

P. multocida además de producir la pasteurelosis neumónica de los rumiantes está implicada en procesos patológicos económicamente importantes en prácticamente todas las especies domésticas y no domésticas (Wilson y Ho, 2013).

En este trabajo se analizó las características genéticas y la relación de los aislados de *P. multocida* procedentes de pulmones con y sin lesiones neumónicas de corderos en matadero mediante análisis por MLST y VAG. Estas características se compararon con las de aislados de porcino (García-Alvarez *et al.*, 2017) y también con las de otras especies animales publicadas en las bases de datos MLST de *P. multocida*. Para *P. multocida* se desarrollaron dos sistemas de MLST, uno desarrollado para la tipificación de aislados aviares desarrollado por “*Pasteurella multocida Rural Industries Research and Development Corporation*”, RIRDC, y otro denominado Multi-host desarrollado para incluir aislados de múltiples hospedadores. En este estudio se utilizó inicialmente el sistema Multi-host para tipificar todos los aislados. No obstante, el sistema RIRDC incluyó con el tiempo también múltiples hospedadores y en el momento de análisis de los datos incluía muchos más aislados

de ovino que el sistema Multi-host. Por tanto, se utilizó este segundo sistema para confirmar algunos de los resultados obtenidos.

En el análisis MLST Multi-host, los aislados de ovino mostraron niveles moderados de diversidad genética (DG=0,37) con 16 ST identificados (Tabla 4.5). De ellos, 13 se describieron por primera vez en este estudio (ST48, ST49, ST50, ST51, ST52, ST53, ST54, ST55, ST56, ST57, ST58, ST59 y ST60) mientras que tres (ST19, ST20 y ST29) habían sido detectados según la base de datos pública de MLST. Aunque la cantidad de estudios de tipificación de aislados ovinos por MLST es muy limitado, los resultados de este estudio están en línea con la diversidad genética observada entre aislados clínicos de ovinos procedentes de neumonía (Hotchkiss *et al.*, 2011; Einarsdottir *et al.*, 2016). Estos resultados demuestran que diversos genotipos de *P. multocida* pueden asociarse con este proceso clínico en esta especie animal, al igual que lo observado en *M. haemolytica* (García-Alvarez *et al.*, 2018). A pesar de la diversidad genética entre las cepas procedentes de casos de neumonía en ovino, todos los aislados se agruparon en dos grupos genéticos (GgOv1 y GgOv2; Figura 4.6). Estos grupos genéticos incluyeron STs detectados exclusivamente en ovino y exhibieron un alto grado de relación genética en cada grupo, lo que sugiere una adaptación de estos grupos genéticos al ganado ovino. En *P. multocida* se considera que una cierta especificidad de hospedador y/o enfermedad basándose en la distribución de serotipos (Ewers *et al.*, 2006; Boyce *et al.*, 2010), es decir, cepas de determinados serotipos se asocian a algunos procesos aunque no son exclusivas. Por ejemplo, se considera que la rinitis atrófica porcina se asocia preferentemente a cepas del tipo capsular D, el cólera aviar cepas del tipo F, la septicemia hemorrágica bovina a determinadas cepas del tipo B, mientras que los procesos bronconeumónicos se asocian a cepas de los tipos capsulares A y D en todas las especies. En este estudio se comprueba a nivel genético la existencia de determinados genotipos de *P. multocida* asociados al ovino.

La mayoría de los aislados ovinos (32/43; 74,4%) fueron *toxA*⁺ (Tabla 4.5). Este porcentaje está de acuerdo con los datos aportados por estudios previos en aislados ovinos (Ewers *et al.*, 2006; Shayegh *et al.*, 2008; Sarangi *et al.*, 2015; Vougidou *et al.*, 2015; Shirzad Aski y Tabatabaei, 2016). Einarsdottir y colaboradores

detectaron que el 100% de aislados de *P. multocida* procedentes de ovejas con síntomas respiratorios fueron *toxA*⁺ (Einarsdottir *et al.*, 2016). En otros estudios, el porcentaje de aislados *toxA*⁺ procedentes de ovejas varió entre 50% y 93% (Shayegh *et al.*, 2008; Sarangi *et al.*, 2015; Vougidou *et al.*, 2015; Shirzad Aski y Tabatabaei, 2016).

Aunque el papel de *toxA*⁺ en la patogenia de la neumonía ovina sigue siendo desconocido, la alta prevalencia de *toxA*⁺ entre aislados procedentes de neumonía, evidencia un papel epidemiológico importante de estos aislados para esta especie. El gen *toxA* se asoció significativamente con el tipo capsular A en los aislados de ovino ($P < 0,05$; Tabla 4.5), de acuerdo con estudios previos (Shayegh *et al.*, 2008; Sarangi *et al.*, 2015; Vougidou *et al.*, 2015). Por el contrario, en los aislados de porcino causantes de la rinitis atrófica el gen *toxA* se asoció a las cepas del tipo capsular D (Tang *et al.*, 2009; Garcia *et al.*, 2011).

A pesar de la elevada prevalencia del gen *toxA* detectada en aislados ovinos en la última década (Ewers *et al.*, 2006; Shayegh *et al.*, 2008; Sarangi *et al.*, 2015; Vougidou *et al.*, 2015; Einarsdottir *et al.*, 2016; Shirzad Aski y Tabatabaei, 2016; García-Alvarez *et al.*, 2017) hasta el momento no se había demostrado la expresión de la proteína PMT en los aislados ovinos. En este trabajo se analizó la capacidad de los aislados *toxA*⁺ de producir la toxina mediante la detección del antígeno con una técnica ELISA comercial. Este kit comercial ha sido ampliamente utilizado en la detección de la toxina en aislados porcinos (Bowersock *et al.*, 1992; Mattsson *et al.*, 1992; Levonen *et al.*, 1996; Amigot *et al.*, 1998; Hariharan *et al.*, 2000; Townsend *et al.*, 2000; MacInnes *et al.*, 2008). La mayoría de los aislados (54/58; 93,1%) resultaron positivos a la expresión del antígeno PMT. Estos resultados indican que las cepas portadoras del gen *toxA* son capaces de producir la toxina. Aunque en estudios experimentales en conejos se ha indicado la capacidad de cepas toxigénicas de producir lesiones neumónicas (Suckow, 2000), queda por determinar el posible papel de la toxina PMT en la patogénesis de las lesiones neumónicas y la implicación de estas cepas en la etiología de la pasteurelosis neumónica ovina.

El gen *tbpA* fue detectado en todos los aislados ovinos menos en uno (97,7%; Tabla 4.5), una gran distribución que también está de acuerdo con estudios previos

(Shayegh *et al.*, 2008; Sarangi *et al.*, 2015). Con la excepción de un solo aislado de *P. multocida* de conejos descrito anteriormente (García-Alvarez *et al.*, 2015), todos los aislados de *tbpA*⁺ se han detectado exclusivamente en rumiantes incluyendo ovejas, cabras y vacas (Ewers *et al.*, 2006; Katsuda *et al.*, 2013; Verma *et al.*, 2013; Sarangi *et al.*, 2015; Shirzad Aski y Tabatabaei, 2016). Los resultados de este estudio corrobora el hecho de que el gen *tbpA* pueda ser considerado específico de rumiante y podría ser un buen marcador de la especificidad del hospedador (Shirzad Aski y Tabatabaei, 2016).

Los aislados de *P. multocida* se distribuyeron en cinco “virulotipos” diferentes en función de la presencia de los cuatro genes analizados. El perfil de VAG detectado en la mayoría de aislados de ovino (69,8%; Tabla 4.5) fue *tbpA*⁺/*toxA*⁺. La presencia del gen *toxA* asociado al gen *tbpA* en estos aislados, además de la asociación del gen *toxA* al tipo capsular A, indica que estos aislados *toxA* positivos son diferentes de los aislados *toxA* positivos causantes de la rinitis atrófica porcina (García-Alvarez *et al.*, 2017).

Cuando se compararon las características genotípicas de estos aislados con aislados de porcino (García-Alvarez *et al.*, 2017) y con los aislados de otras especies (Hotchkiss *et al.*, 2011; Vougidou *et al.*, 2015), se observó que mientras que las cepas de ovino pertenecen a STs detectados exclusivamente en pequeños rumiantes, los aislados de otras especies como cerdos, bovino y conejos pertenecen a STs que en su mayoría contienen aislados de múltiples especies. No obstante, los STs detectados en ovino por el sistema Multi-host se detectaron por primera vez y teniendo en cuenta que el momento del análisis el número de aislados de ovino contenidos en la base de datos procedentes de otros estudios era muy limitado se decidió utilizar el sistema MLST RIRDC para disponer de una base de datos más extensa para la comparación.

Por el sistema MLST RIRDC se analizaron 12 aislados representativos de los ST determinados por el esquema MLST Multi-host. No hubo una equivalencia total entre ST de ambos esquemas MLST, lo que podría estar motivado por la diferencia en tres de los siete genes estructurales utilizados en ambos esquemas. Sin embargo, los resultados generales obtenidos por el esquema RIRDC confirmaron los resultados obtenidos por el sistema Multi-host. En total se identificaron 7 STs de las cuales

cuatro se detectaron por primera vez. No obstante, las tres ST identificadas entre aislados ovinos en el presente estudio (ST95_{RIRDC}, ST131_{RIRDC}, ST203_{RIRDC}, Tabla 4.4) y ya presentes previamente en la base de datos MLST RIRDC (http://pubmlst.org/pmultocida_rirdc/) han sido detectados exclusivamente en aislados de *P. multocida* de ovejas, salvo un aislado detectado en una cabra (Tabla 4.4) (Hotchkiss *et al.*, 2011; Bisgaard *et al.*, 2013). Estos resultados confirman los obtenidos por el sistema Multi-host. La detección de estas ST casi exclusivamente en ovejas, con la excepción de un aislado de cabra, podría indicar la existencia de grupos genéticos de *P. multocida* adaptados a este hospedador, o al menos a pequeños rumiantes.

PERSPECTIVAS DE FUTURO

M. haemolytica y *P. multocida* son los principales agentes etiológicos de la pasteurelisis neumónica ovina (Odugbo *et al.*, 2006; Donachie, 2007; Pinto, 2011). *M. haemolytica* es un patógeno específico de los rumiantes asociado a principalmente a procesos neumónicos (Donachie, 2007; Omaleki *et al.*, 2015; 2016), mientras que *P. multocida* produce diversas enfermedades en un amplio rango de hospedadores incluyendo mamíferos y aves (Brogden *et al.*, 1978; Gilmour, 1978; Adlam y Rutter, 1989; Rimler, 1989; Brogden *et al.*, 1998; Davies *et al.*, 2003; Weiser *et al.*, 2003; Dabo *et al.*, 2007; Besser *et al.*, 2013). En este estudio se han caracterizado genotípicamente aislados de ambas bacterias asociados a los procesos neumónicos en el ganado ovino. El análisis de MLST indica la existencia de subpoblaciones de *M. haemolytica* asociadas al ganado ovino dentro de los rumiantes. De forma similar, el análisis MLST por ambos sistemas de *P. multocida* y los perfiles de virulencia indican la existencia de subpoblaciones de *P. multocida* asociadas a los procesos neumónicos en ovino. En cuanto a los perfiles de virulencia, el hecho de que en ambas bacterias el gen *tbpA*, asociado a la captación del hierro considerado específico de los rumiantes (Ewers *et al.*, 2006; Bethe *et al.*, 2009; Boyce *et al.*, 2010; Katsuda *et al.*, 2013), esté presente en virtualmente todos los aislados tanto de *M. haemolytica* como de *P. multocida* es consistente con una cierta adaptación de estas bacterias a los rumiantes. Estos resultados pueden ser la base para el estudio de vacunas para la prevención de las pasteurelisis neumónicas diseñadas específicamente para los pequeños rumiantes.

En este estudio se analizaron aislados de *M. haemolytica* y *P. multocida* procedentes de pulmones con y sin lesiones neumónicas. Los aislados de ambas bacterias se habían aislado de forma significativamente superior de las lesiones neumónicas que de los pulmones sin lesiones (Pinto, 2011). La tipificación molecular de los aislados de *M. haemolytica* por MLST, PFGE y perfiles de virulencia no demostraron diferencias entre los aislados procedentes de las lesiones neumónicas y los procedentes de pulmones sin lesiones. Además, demostraron en ambos tipos de aislados una importante diversidad genética. Estos resultados indican un papel de *M. haemolytica* como patógenos oportunista en los procesos neumónicos ovinos que estarían causados por cepas comensales residentes del tracto respiratorio superior que descienden al pulmón cuando sobrepasan las defensas del hospedador. Este hecho pone en relieve la importancia de otros factores como las infecciones concurrentes y factores ambientales y de manejo en la epidemiología de estos procesos en ovino (Galapero *et al.*, 2016). No obstante, este estudio se ha limitado a al estudio de aislados procedentes de procesos subclínicos o crónicos detectados en matadero. En el futuro, el estudio debería hacerse extensivo a los aislados procedentes de brotes clínicos en los que puede haber una elevada mortalidad.

En cuanto a *P. multocida*, tampoco se observaron diferencias en la tipificación molecular de los aislados procedentes de pulmones neumónicos y no neumónicos (datos no mostrados), si bien el limitado número de aislados procedentes de pulmones no neumónicos no permite realizar un análisis estadístico para determinar diferencias si las hubiera. No obstante, *P. multocida* es también un habitante habitual de la nasofaringe de los rumiantes (Wilson y Ho, 2013). Los resultados de este estudio indican que los aislados de *P. multocida* que desciende al pulmón y se asocian a las lesiones neumónicas son una subpoblación relativamente homogénea desde el punto de vista genético, puesto que la mayoría de los aislados están estrechamente relacionados y se agrupan en solo dos grupos genéticos, y en cuanto a su perfil de virulencia, puesto que la mayoría de los aislados mostraron el perfil *tbpA+*/*toxA+*. En este estudio también se ha demostrado que la mayoría de las cepas de *P. multocida* asociadas a las lesiones son toxigénicas. No obstante, estas cepas toxigénicas son genéticamente distintas de las que se asocian a la rinitis

atrófica porcina. Queda por determinar si la toxina tiene algún papel en el desarrollo de las lesiones neumónicas en el ganado ovino.

Por último, *P. multocida* es un agente potencialmente zoonótico. La transmisión se produce principalmente por mordedura aunque también se ha descrito la transmisión por contacto directo con animales (Wilson y Ho, 2013). Por su parte, *M. haemolytica* se considera no zoónotica, no obstante se han descrito casos de transmisión a humana de especies del género *Mannheimia* (Lau *et al.*, 2015). El papel de *P. multocida* como agente zoonótico ha sido muy poco estudiado así como otros aspectos relacionados con la salud pública como las resistencias antimicrobianas en los aislados de pequeños rumiantes.

6. CONCLUSIONES



1. Los tipos de secuencia ST16, ST28 y ST8 incluyeron el 80,3% de los aislados de *M. haemolytica* lo que indica una amplia distribución de estos genotipos en los pequeños rumiantes.
2. El análisis de la base de datos de MLST de *M. haemolytica* indica que estos tres STs (ST16, ST28 y ST8), además de estar ampliamente distribuidos en pequeños rumiantes, no están presentes en bovino lo que parece indicar una adaptación de ciertos genotipos de *M. haemolytica* a los pequeños rumiantes.
3. La ausencia de diferencias significativas ($P > 0,05$) en la distribución de los genotipos más frecuentes (ST16, ST28 y ST8) detectados por MLST (81,3% vs. 80,4%) y por tipificación de los perfiles de virulencia (64% vs. 65,1%) de los aislados de *M. haemolytica* procedentes de lesiones neumónicas y de pulmones sin lesiones, junto con en el nivel de diversidad genética (DG 0,66 y DG 0,69, respectivamente) detectada por análisis de electroforesis de campo pulsado (PFGE), indica que las poblaciones de *M. haemolytica* procedentes de lesiones neumónicas y de pulmones sin lesiones son poblaciones genéticamente homogéneas.
4. En el análisis de electroforesis de campo pulsado (PFGE) de los aislados ovinos de *M. haemolytica* se observó un alto nivel de diversidad genética lo que indica que múltiples genotipos pueden ser causantes de casos individuales de neumonía en ovino.
5. Los genotipos ST50 (12/43; 27,9%) y ST19 (11/43; 25,6%) de *P. multocida*, según el sistema Multi-host englobaron, el 53,5% de los aislados indicando que ambos están ampliamente distribuidos en ovino.
6. Los análisis MLST por ambos sistemas de *P. multocida*, el Multi-host y el RIRDC, demostraron que los grupos genéticos y genotipos detectados en ovino incluían exclusivamente STs detectadas en rumiantes, mayoritariamente ovino, según ambas bases de datos públicas, lo que sugiere una adaptación específica de estos grupos al ovino.
7. La presencia del gen *toxA* en combinación con el *tbpA*, específico de rumiantes, en el perfil mayoritario (69,8%) de los aislados de *P. multocida* ovinos y su

asociación con el tipo capsular A, indican que estas cepas ovinas son genéticamente distintas de las cepas toxigénicas asociadas a la rinitis atrófica porcina.

8. La detección de la producción de la toxina PMT por ELISA en la mayoría (93,1%) de los aislados de *P. multocida* portadores del gen *toxA* evidencia la capacidad toxigénica de estas cepas.

REFERENCIAS

- Abdullah KM, Lo RY, Mellors A (1990) Distribution of glycoprotease activity and the glycoprotease gene among serotypes of *Pasteurella haemolytica*. *Biochemical Society transactions* 18:901-903
- Ackermann MR, Brogden KA (2000) Response of the ruminant respiratory tract to *Mannheimia* (*Pasteurella*) *haemolytica*. *Microbes and Infection* 2:1079-1088
- Adamu J (2007) *Mannheimia haemolytica*: phylogeny and genetic analysis of its major virulence factors. *Israel Journal of Veterinary Medicine* 62:6
- Adlam C, Knights JM, Mugridge A, Lindon JC, Baker PR, Beesley JE, Spacey B, Craig GR, Nagy LK (1984) Purification, characterization and immunological properties of the serotype-specific capsular polysaccharide of *Pasteurella haemolytica* (serotype A1) organisms. *J Gen Microbiol* 130:2415-2426
- Adlam C, Rutter JM (1989) *Pasteurella* and *Pasteurellosis*. Academic Press
- Aitken I (2008) *Diseases of Sheep*. Wiley
- Amigot JA, Torremorell M, Pijoan C (1998) Evaluation of Techniques for the Detection of Toxigenic *Pasteurella Multocida* Strains from Pigs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 10:169-173
- Angelini M, Stehling EG, Moretti ML, Silveira WDd (2009) Molecular epidemiology of *Shigella* spp strains isolated in two different metropolitan areas of southeast Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* 40:685-692
- Angen Ø, Ahrens P, Bisgaard M (2002) Phenotypic and genotypic characterization of *Mannheimia* (*Pasteurella*) *haemolytica*-like strains isolated from diseased animals in Denmark. *Vet Microbiol* 84:103-114

- Angen Ø, Mutters R, Caugant DA, Olsen JE, Bisgaard M (1999) Taxonomic relationships of the [*Pasteurella*] haemolytica complex as evaluated by DNA-DNA hybridizations and 16S rRNA sequencing with proposal of *Mannheimia* haemolytica gen. nov., comb. nov., *Mannheimia granulomatis* comb. nov., *Mannheimia glucosida* sp. nov., *Mannheimia ruminalis* sp. nov. and *Mannheimia varigena* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 49:67-86
- Angen Ø, Thomsen J, Larsen LE, Larsen J, Kokotovic B, Heegaard PMH, Enemark JMD (2009) Respiratory disease in calves: Microbiological investigations on trans-tracheally aspirated bronchoalveolar fluid and acute phase protein response. *Veterinary Microbiology* 137:165-171
- Backstrand JM, Botzler RG (1986) Survival of *Pasteurella multocida* in soil and water in an area where avian cholera is enzootic. *Journal of wildlife diseases* 22:257-259
- Behringer M, Miller WG, Oyarzabal OA (2011) Typing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from live broilers and retail broiler meat by flaA-RFLP, MLST, PFGE and REP-PCR. *J Microbiol Methods* 84:194-201
- Besser TE, Frances Cassirer E, Highland MA, Wolff P, Justice-Allen A, Mansfield K, Davis MA, Foreyt W (2013) Bighorn sheep pneumonia: sorting out the cause of a polymicrobial disease. *Preventive veterinary medicine* 108:85-93
- Bethe A, Wieler LH, Selbitz H-J, Ewers C (2009) Genetic diversity of porcine *Pasteurella multocida* strains from the respiratory tract of healthy and diseased swine. *Veterinary Microbiology* 139:97-105
- Biberstein E, Gills M, Knight H (1960) Serological types of *Pasteurella hemolytica*. *Cornell Veterinarian* 50:283-300
- Biberstein EL, Gills MG (1962) The relation of the antigenic types to the A and T types of *Pasteurella haemolytica*. *Journal of Comparative Pathology* 72:316

- Bienhoff S, Allen G, Berg J (1992) Release of tumor necrosis factor-alpha from bovine alveolar macrophages stimulated with bovine respiratory viruses and bacterial endotoxins. *Veterinary immunology and immunopathology* 30:341-357
- Bisgaard M, Petersen A, Christensen H (2013) Multilocus sequence analysis of *Pasteurella multocida* demonstrates a type species under development. *Microbiology* 159:580-590
- Blackall P, Pahoff J, Marks D, Fegan N, Morrow C (1995) Characterisation of *Pasteurella multocida* isolated from fowl cholera outbreaks on turkey farms. *Australian Veterinary Journal* 72:135-138
- Blackall PJ, Bojesen AM, Christensen H, Bisgaard M (2007) Reclassification of [*Pasteurella*] *trehalosi* as *Bibersteinia trehalosi* gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 57:666-674
- Blackall PJ, Fegan N, Chew GT, Hampson DJ (1998) Population structure and diversity of avian isolates of *Pasteurella multocida* from Australia. *Microbiology* 144 (Pt 2):279-289
- Blackall PJ, Pahoff JL, Bowles R (1997) Phenotypic characterisation of *Pasteurella multocida* isolates from Australian pigs. *Veterinary Microbiology* 57:355-360
- Bowersock TL, Hooper T, Pottenger R (1992) Use of ELISA to Detect Toxigenic *Pasteurella Multocida* in Atrophic Rhinitis in Swine. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 4:419-422
- Boyce JD, Chung JY, Adler B (2000) *Pasteurella multocida* capsule: composition, function and genetics. *Journal of Biotechnology* 83:153-160
- Boyce JD, Harper M, Wilkie IW, Adler B (2010) *Pasteurella*. In: *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*. Wiley-Blackwell
- Boyce JD, Lo RYC, Wilkie I, Adler B (2008) *Pasteurella* and *Mannheimia*. In: *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*. Blackwell Publishing

- Brako EE, Fulton RW, Nicholson SS, Amborski GF (1984) Prevalence of bovine herpesvirus-1, bovine viral diarrhea, parainfluenza-3, goat respiratory syncytial, bovine leukemia, and bluetongue viral antibodies in sheep. American journal of veterinary research 45:813-816
- Bredy JP, Botzler RG (1989) The effects of six environmental variables on *Pasteurella multocida* populations in water. Journal of wildlife diseases 25:232-239
- Breider M, Kumar S, Corstvet R (1990) Bovine pulmonary endothelial cell damage mediated by *Pasteurella haemolytica* pathogenic factors. Infection and immunity 58:1671-1677
- Brogden K, Rhoades K, Heddleston K (1978) A new serotype of *Pasteurella multocida* associated with fowl cholera. Avian diseases:185-190
- Brogden KA, Adlam C, Lehmkuhl HD, Cutlip RC, Knights JM, Engen RL (1989) Effect of *Pasteurella haemolytica* (A1) capsular polysaccharide on sheep lung in vivo and on pulmonary surfactant in vitro. American journal of veterinary research 50:555-559
- Brogden KA, Lehmkuhl HD, Cutlip RC (1998) *Pasteurella haemolytica* complicated respiratory infections in sheep and goats. Vet Res 29:233-254
- Burrows LL, Olah-Winfield E, Lo R (1993) Molecular analysis of the leukotoxin determinants from *Pasteurella haemolytica* serotypes 1 to 16. Infection and immunity 61:5001-5007
- Cameron CM, Bester FJ (1984) Formulation of an effective *Pasteurella multocida* vaccine for sheep. The Onderstepoort journal of veterinary research 51:189-191
- Cardozo-Bernal AM, Ramon LF, Poutou-Piñales RA, Carrascal-Camacho AK, Zambrano DC (2013) Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE) para la diferenciación molecular de *Listeria monocytogenes*. Universitas Scientiarum 18:203-222

- Carter G (1955) Studies on *Pasteurella multocida*. 1. A haemagglutination test for the identification of serological types. American Journal of Veterinary Diseases:481 – 484
- Clarke L, Millar BC, Moore JE (2003) Extraction of genomic DNA from *Pseudomonas aeruginosa*: a comparison of three methods. Br J Biomed Sci 60:34-35
- Coll P, Coque M, Dominguez M, Vázquez J, Vila J, Cercenado E, Cantón R (2005) Métodos moleculares de tipificación epidemiológica en bacteriología. Procedimientos de microbiología clínica Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC)
- Constable PD, Hinchcliff KW, Done SH, Gruenberg W (2016) Veterinary Medicine: A Textbook of the Diseases of Cattle, Horses, Sheep, Pigs and Goats - Two-Volume Set. Elsevier Health Sciences
- Chan M-S, Maiden MCJ, Spratt BG (2001) Database-driven Multi Locus Sequence Typing (MLST) of bacterial pathogens. Bioinformatics 17:1077-1083
- Dabo SM, Confer AW, Murphy GL (1997) Outer membrane proteins of bovine *Pasteurella multocida* serogroup A isolates. Veterinary Microbiology 54:167-183
- Dabo SM, Taylor JD, Confer AW (2007) *Pasteurella multocida* and bovine respiratory disease. Anim Health Res Rev 8:129-150
- Dassanayake RP, Shanthalingam S, Herndon CN, Lawrence PK, Frances Cassirer E, Potter KA, Foreyt WJ, Clinkenbeard KD, Srikumaran S (2009) *Mannheimia haemolytica* serotype A1 exhibits differential pathogenicity in two related species, *Ovis canadensis* and *Ovis aries*. Vet Microbiol 133:366-371
- Davies DH, Davis GB, McSporran KD, Price MC (1983) Vaccination against ovine pneumonia: a progress report. New Zealand veterinary journal 31:87-90

- Davies R, Watson P, Caffrey B (2003) Comparative analyses of *Pasteurella multocida* strains associated with the ovine respiratory and vaginal tracts. *The Veterinary Record* 152:7-10
- Davies RL (2004) Genetic diversity among *Pasteurella multocida* strains of avian, bovine, ovine and porcine origin from England and Wales by comparative sequence analysis of the 16S rRNA gene. *Microbiology* 150:4199-4210
- Davies RL, Arkinsaw S, Selander RK (1997) Evolutionary genetics of *Pasteurella haemolytica* isolates recovered from cattle and sheep. *Infect Immun* 65:3585-3593
- Davies RL, Donachie W (1996) Intra-specific diversity and host specificity within *Pasteurella haemolytica* based on variation of capsular polysaccharide, lipopolysaccharide and outer-membrane proteins. *Microbiology* 142 (Pt 7):1895-1907
- Davies RL, MacCorquodale R, Reilly S (2004) Characterisation of bovine strains of *Pasteurella multocida* and comparison with isolates of avian, ovine and porcine origin. *Vet Microbiol* 99:145-158
- De Alwis M (1992) Pasteurellosis in production animals: a review. In: *Pasteurellosis in Production Animals*. Australian Centre for International Agricultural Research
- De Alwis MC (1999) Haemorrhagic septicaemia, Australian Centre for International Agricultural Research Canberra, ACT, Australia
- Dingle KE, Colles FM, Wareing DR, Ure R, Fox AJ, Bolton FE, Bootsma HJ, Willems RJ, Urwin R, Maiden MC (2001) Multilocus sequence typing system for *Campylobacter jejuni*. *J Clin Microbiol* 39:14-23
- Donachie W (1995) Vaccine Development Against *Pasteurella Haemolytica* Infections in Sheep. In: Donachie W, Lainson FA, Hodgson JC (eds) *Haemophilus, Actinobacillus, and Pasteurella*. Springer US, Boston, MA
- Donachie W (2007) Pasteurellosis. In: *Diseases of Sheep*. Blackwell Publishing Ltd

- Dungal N (1931) Contagious pneumonia in sheep. *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics* 44:126-143
- Einarsdottir T, Gunnarsson E, Sigurdardottir OG, Jorundsson E, Fridriksdottir V, Thorarinsdottir GE, Hjartardottir S (2016) Variability of *Pasteurella multocida* isolated from Icelandic sheep and detection of the *toxA* gene. *Journal of Medical Microbiology* 65:897-904
- Ejrnaes K, Sandvang D, Lundgren B, Ferry S, Holm S, Monsen T, Lundholm R, Frimodt-Moller N (2006) Pulsed-field gel electrophoresis typing of *Escherichia coli* strains from samples collected before and after pivmecillinam or placebo treatment of uncomplicated community-acquired urinary tract infection in women. *J Clin Microbiol* 44:1776-1781
- Enright MC, Day NP, Davies CE, Peacock SJ, Spratt BG (2000) Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 38:1008-1015
- Enright MC, Spratt BG (1998) A multilocus sequence typing scheme for *Streptococcus pneumoniae*: identification of clones associated with serious invasive disease. *Microbiology* 144 (Pt 11):3049-3060
- Eurostat (2017) Agriculture, forestry and fishery statistics. 2017 edition, Vol 2017 Edition. Publications Office of the European Union, Luxembourg
- Ewers C, Lübke-Becker A, Bethe A, Kießling S, Filter M, Wieler LH (2006) Virulence genotype of *Pasteurella multocida* strains isolated from different hosts with various disease status. *Veterinary Microbiology* 114:304-317
- Ewers C, Lubke-Becker A, Wieler LH (2004) [*Mannheimia haemolytica* and the pathogenesis of enzootic bronchopneumonia]. *Berliner und Munchener tierarztliche Wochenschrift* 117:97-115
- Faber R, Hartwig N, Busby D, BreDahl R (2000) The costs and predictive factors of bovine respiratory disease in standardized steer tests. *Beef Research Report*, 1999. 24.

- FAO (2016) Trade and Market Division: Biannual Report On Global Food Markets, 2016. In: FAO (ed), Book I5703. FAO
- Fegan N, Blackall PJ, Pahoff JL (1995) Phenotypic characterisation of *Pasteurella multocida* isolates from Australian poultry. *Veterinary Microbiology* 47:281-286
- Feil EJ, Li BC, Aanensen DM, Hanage WP, Spratt BG (2004) eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. *J Bacteriol* 186:1518-1530
- Fernández Cuenca F, López Cerero L, Pascual Hernández Á (2013) Técnicas de tipificación molecular para la vigilancia y control de la infección. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 31, Supplement 1:20-25
- Fernández S, Galapero J, Gómez L, Pérez CJ, Cid D, Martín MC, Alonso JM, Rey J (2016) *Mannheimia haemolytica* and *Bibersteinia trehalosi* Serotypes Isolated from Merino Breed Lambs in Extremadura (Southwestern Spain). *Indian Journal of Microbiology* 56:513-515
- Fodor L, Varga J, Hajtos I, Molnar T (1999) Serotypes of *Pasteurella haemolytica* and *Pasteurella trehalosi* isolated from farm animals in Hungary. *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B Journal of veterinary medicine Series B* 46:241-247
- Fulton RW, Downing MM, Hagstad HV (1982) Prevalence of bovine herpesvirus-1, bovine oral diarrhea, parainfluenza-3, bovine adenoviruses-3 and -7, and goat respiratory syncytial viral antibodies in goats. *American journal of veterinary research* 43:1454-1457
- Furian TQ, Borges KA, Pilatti RM, de Almeida CN, Streck AF, de Emery BD, Nascimento VPd, Salle CTP, de Souza Moraes HL (2016) Use of Molecular Pathogenicity Indices to Identify Pathogenic Strains of *Pasteurella multocida*. *Avian Diseases* 60:792-798

- Galapero J, Fernández S, Pérez CJ, Calle-Alonso F, Rey J, Gómez L (2016) Identifying risk factors for ovine respiratory processes by using Bayesian networks. *Small Ruminant Research* 136:113-120
- Galvao NN, Chiarini E, Destro MT, de Aguiar Ferreira M, Nero LA (2012) PFGE characterisation and adhesion ability of *Listeria monocytogenes* isolates obtained from bovine carcasses and beef processing facilities. *Meat Science* 92:635-643
- Garcia-Alvarez A, Chaves F, Fernandez A, Sanz C, Borobia M, Cid D (2015) An ST11 clone of *Pasteurella multocida*, widely spread among farmed rabbits in the Iberian Peninsula, demonstrates respiratory niche association. *Infection Genetics and Evolution* 34:81-87
- García-Alvarez A, Vela AI, San Martín E, Chaves F, Fernández-Garayzábal JF, Lucas D, Cid D (2017) Characterization of *Pasteurella multocida* associated with ovine pneumonia using multi-locus sequence typing (MLST) and virulence-associated gene profile analysis and comparison with porcine isolates. *Veterinary Microbiology* 204:180-187
- García-Alvarez A, Fernández-Garayzábal JF, Chaves F, Pinto C, Cid D (2018) Ovine *Mannheimia haemolytica* isolates from lungs with and without pneumonic lesions belong to similar genotypes. *Veterinary Microbiology* 219:80-86
- García N, Fernandez-Garayzabal JF, Goyache J, Dominguez L, Vela AI (2011) Associations between biovar and virulence factor genes in *Pasteurella multocida* isolates from pigs in Spain. *Vet Rec* 169:362
- George JL, Martin DJ, Lukacs PM, Miller MW (2008) Epidemic pasteurellosis in a bighorn sheep population coinciding with the appearance of a domestic sheep. *Journal of wildlife diseases* 44:388-403
- Gilmour NJ (1978) Pasteurellosis in sheep. *Vet Rec* 102:100-102

- Gilmour NJ, Donachie W, Sutherland AD, Gilmour JS, Jones GE, Quirie M (1991) Vaccine containing iron-regulated proteins of *Pasteurella haemolytica* A2 enhances protection against experimental pasteurellosis in lambs. *Vaccine* 9:137-140
- Goering RV (1993) Molecular epidemiology of nosocomial infection: analysis of chromosomal restriction fragment patterns by pulsed-field gel electrophoresis. *Infect Control Hosp Epidemiol* 14:595-600
- Goodwin-Ray K, Stevenson M, Heuer C (2008a) Effect of vaccinating lambs against pneumonic pasteurellosis under New Zealand field conditions on their weight gain and pneumonic lung lesions at slaughter. *The Veterinary record* 162:9-11
- Goodwin-Ray KA, Stevenson M, Heuer C (2008b) Flock-level case-control study of slaughter-lamb pneumonia in New Zealand. *Preventive Veterinary Medicine* 85:136-149
- Goodwin KA, Jackson R, Brown C, Davies PR, Morris RS, Perkins NR (2004) Pneumonic lesions in lambs in New Zealand: patterns of prevalence and effects on production. *New Zealand veterinary journal* 52:175-179
- Griffin D (1997) Economic Impact Associated with Respiratory Disease in Beef Cattle. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 13:367-377
- Hariharan H, Cepica A, Qian B, Heaney S, Hurnik D (2000) Toxigenic and drug resistance properties of porcine *Pasteurella multocida* isolates from Prince Edward Island. *The Canadian Veterinary Journal* 41:798-798
- Heddleston KL, Gallagher JE, Rebers PA (1972) Fowl cholera: gel diffusion precipitin test for serotyping *Pasteruella multocida* from avian species. *Avian Dis* 16:925-936
- Highlander SK (2001) Molecular genetic analysis of virulence in Mannheimia (*Pasteurella*) *haemolytica*. *Front Biosci* 6:D1128-D1150

- Homan WL, Tribe D, Poznanski S, Li M, Hogg G, Spalburg E, Van Embden JD, Willems RJ (2002) Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecium*. J Clin Microbiol 40:1963-1971
- Hotchkiss EJ, Hodgson JC, Lainson FA, Zadoks RN (2011) Multilocus sequence typing of a global collection of *Pasteurella multocida* isolates from cattle and other host species demonstrates niche association. BMC Microbiol 11:115
- Katsuda K, Hoshino K, Ueno Y, Kohmoto M, Mikami O (2013) Virulence genes and antimicrobial susceptibility in *Pasteurella multocida* isolates from calves. Veterinary Microbiology 167:737-741
- Katsuda K, Kohmoto M, Kawashima K, Tsunemitsu H, Tsuboi T, Eguchi M (2003) Molecular typing of *Mannheimia* (*Pasteurella*) *haemolytica* serotype A1 isolates from cattle in Japan. Epidemiology and Infection 131:939-946
- Kehrenberg C, Schulze-Tanzil G, Martel J-L, Chaslus-Dancla E, Schwarz S (2001) Antimicrobial resistance in *Pasteurella* and *Mannheimia*: epidemiology and genetic basis. Veterinary research 32:323-339
- Kirkan Ş, Kaya O (2005) Serotyping of *Mannheimia haemolytica* strains isolated from pneumonic lungs of sheep in the Aydın region of Turkey. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences 29:491-494
- Klima CL, Alexander TW, Hendrick S, McAllister TA (2014) Characterization of *Mannheimia haemolytica* isolated from feedlot cattle that were healthy or treated for bovine respiratory disease. Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche veterinaire 78:38-45
- Klima CL, Alexander TW, Read RR, Gow SP, Booker CW, Hannon S, Sheedy C, McAllister TA, Selinger LB (2011) Genetic characterization and antimicrobial susceptibility of *Mannheimia haemolytica* isolated from the nasopharynx of feedlot cattle. Veterinary Microbiology 149:390-398

- Klima CL, Alexander TW, Selinger LB, Read RR, Shewan PE, Gow SP, Booker CW, McAllister TA (2010) Comparison of repetitive PCR and pulsed-field gel electrophoresis for the genotyping of *Mannheimia haemolytica*. *Journal of Microbiological Methods* 81:39-47
- Kodjo A, Villard L, Bizet C, Martel JL, Sanchis R, Borges E, Gauthier D, Maurin F, Richard Y (1999) Pulsed-field gel electrophoresis is more efficient than ribotyping and random amplified polymorphic DNA analysis in discrimination of *Pasteurella haemolytica* strains. *J Clin Microbiol* 37:380-385
- Koneman EW, Giovanniello O (2008) Diagnóstico microbiológico : texto y atlas en color. Medica Panamericana, Buenos Aires; México
- Lacasta D, Ferrer LM, Ramos JJ, González JM, De las Heras M (2008) Influence of climatic factors on the development of pneumonia in lambs. *Small Ruminant Research* 80:28-32
- Lainson FA, Aitchison KD, Donachie W, Thomson JR (2002) Typing of *Pasteurella multocida* Isolated from Pigs with and without Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome. *Journal of Clinical Microbiology* 40:588-593
- Lau JS, Omeleki L, Turni C, Barber SR, Browning GF, Francis MJ, Graham M, Korman TM (2015) Human wound infection with *Mannheimia glucosida* following lamb bite. *Journal of clinical microbiology:JCM*. 01249-01215
- Lawrence PK, Shanthalingam S, Dassanayake RP, Subramaniam R, Herndon CN, Knowles DP, Rurangirwa FR, Foreyt WJ, Wayman G, Marciel AM, Highlander SK, Srikumaran S (2010) Transmission of *Mannheimia haemolytica* from domestic sheep (*Ovis aries*) to bighorn sheep (*Ovis canadensis*): unequivocal demonstration with green fluorescent protein-tagged organisms. *Journal of wildlife diseases* 46:706-717
- Lehmann KB, Neumann R (1899) Atlas und Grundriss der Bakteriologie und Lehrbuch der speziellen bakteriologischen Diagnostik. In: Lehmann's Medizin, Handatlanten Band X.

- Lehmkuhl HD, Cutlip RC, Bolin SR, Brogden KA (1985) Seroepidemiologic survey for antibodies to selected viruses in the respiratory tract of lambs. American journal of veterinary research 46:2601-2604
- Levonen K, Frandsen PL, Seppanen J, Veijalainen P (1996) Detection of toxigenic *Pasteurella multocida* infections in swine herds by assaying antibodies in sow colostrum. J Vet Diagn Invest 8:455-459
- MacInnes JI, Gottschalk M, Lone AG, Metcalf DS, Ojha S, Rosendal T, Watson SB, Friendship RM (2008) Prevalence of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Actinobacillus suis*, *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, and *Streptococcus suis* in representative Ontario swine herds. Can J Vet Res 72:242-248
- Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant DA, Feavers IM, Achtman M, Spratt BG (1998) Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. Proc Natl Acad Sci U S A 95:3140-3145
- Mannheim W, Carter GR (1984) Family III. Pasteurellaceae Pohl 1981a, 382. In: N K (ed) Bergey's manual of systematic bacteriology, Book 1. Williams and Wilkins., Baltimore, MD
- Martín Espada C, Cid Vázquez D (2013) Pasteurellosis neumónica ovina y caprina. In: SEOC (ed) Epidemiología y control de los procesos respiratorios en Pequeños Rumiantes, Book 13. icesalud vet, Barcelona, Spain
- Martin WB (1982) Respiratory Diseases Induced in Small Ruminants by Viruses and Mycoplasma. Office International des Epizooties
- Mattsson S, Foged N, Soderlind O Evaluation of the 1-step DAKO PMT ELISA for detection of toxin producing *Pasteurella multocida*. In. Proc Proceedings Internafional Pig Veterinary Society Congress 1992

- Mohamed R, Abdelsalam E (2008) A review on pneumonic pasteurellosis (respiratory mannheimiosis) with emphasis on pathogenesis, virulence mechanisms and predisposing factors. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine* 11:139-160
- Mosier DA (1997) Bacterial Pneumonia. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 13:483-493
- Mutters R, Ihm P, Pohl S, Frederiksen W, Mannheim W (1985) Reclassification of the Genus *Pasteurella* Trevisan 1887 on the Basis of Deoxyribonucleic Acid Homology, with Proposals for the New Species *Pasteurella dagmatis*, *Pasteurella canis*, *Pasteurella stomatis*, *Pasteurella anatis*, and *Pasteurella langaa*. *Int J Syst Bacteriol* 35:309-322
- Namioka S, Murata M (1961a) Serological studies on *Pasteurella multocida*. I. A simplified method for capsule typing of the organism. *Cornell Vet* 51:498-521
- Namioka S, Murata M (1961b) Serological studies on *Pasteurella multocida*. III. O antigenic analysis of cultures isolated from various animals. *Cornell Vet* 51:522-528
- Nowrouzian FL, Karami N, Welinder-Olsson C, Åhrén C (2013) Virulence gene typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a complement in epidemiological typing. *Journal of Microbiological Methods* 93:173-176
- Nyarko KA, Coomber BL, Mellors A, Gentry PA (1998) Bovine platelet adhesion is enhanced by leukotoxin and sialoglycoprotease isolated from *Pasteurella haemolytica* A1 cultures. *Veterinary microbiology* 61:81-91
- O'Sullivan DJ, Klaenhammer TR (1993) Rapid Mini-Prep Isolation of High-Quality Plasmid DNA from *Lactococcus* and *Lactobacillus* spp. *Applied and Environmental Microbiology* 59:2730-2733
- Odugbo MO, Odama LE, Umoh JU, Lamorde AG (2006) *Pasteurella multocida* pneumonic infection in sheep: Prevalence, clinical and pathological studies. *Small Ruminant Research* 66:273-277

- Olsen JE, Skov MN, Threlfall EJ, Brown DJ (1994) Clonal lines of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis documented by IS200-, ribo-, pulsed-field gel electrophoresis and RFLP typing. *J Med Microbiol* 40:15-22
- Olson LD, Bond RE (1968) Survival of *Pasteurella multocida* in soil, water, carcasses, and in the mouths of various birds and mammals. *Proc Annu Meet U S Anim Health Assoc* 72:244-246
- Omaleki L, Browning GF, Allen JL, Markham PF, Barber SR (2015) The upper respiratory tract is a natural reservoir of haemolytic *Mannheimia* species associated with ovine mastitis. *Vet Microbiol* 181:308-312
- Omaleki L, Browning GF, Allen JL, Markham PF, Barber SR (2016) Molecular epidemiology of an outbreak of clinical mastitis in sheep caused by *Mannheimia haemolytica*. *Vet Microbiol* 191:82-87
- Pardon B, Hostens M, Duchateau L, Dewulf J, De Bleecker K, Deprez P (2013) Impact of respiratory disease, diarrhea, otitis and arthritis on mortality and carcass traits in white veal calves. *BMC veterinary research* 9:79
- Perez-Losada M, Cabezas P, Castro-Nallar E, Crandall KA (2013) Pathogen typing in the genomics era: MLST and the future of molecular epidemiology. *Infection, Genetics and Evolution* 16:38-53
- Petersen A, Christensen H, Kodjo AI, Weiser GC, Bisgaard M (2009) Development of a multilocus sequence typing (MLST) scheme for *Mannheimia haemolytica* and assessment of the population structure of isolates obtained from cattle and sheep. *Infection, Genetics and Evolution* 9:626-632
- Pinto CE (2011) Epidemiología molecular de las poblaciones bacterianas de *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida* asociadas a la presencia de lesiones neumónicas en corderos en mataderos., Universidad Complutense de Madrid, Madrid

- Posautz A, Loncaric I, K  bber-Heiss A, Knoll A, Walzer C (2014) Acute Die-off of Chamois (*Rupicapra rupicapra*) in the Eastern Austrian Alps due to Bacterial Bronchopneumonia with Pasteurellaceae. *Journal of Wildlife Diseases* 50:616-620
- Quinn PJ, Markey BK, Leonard FC, Hartigan P, Fanning S, Fitzpatrick ES (2013) *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. Wiley
- Rad M, Movassaghi A, Sharifi K, Naseri Z, Seifi H (2011) Two outbreaks of *Pasteurella multocida* septicemia in neonatal lambs. *Comparative Clinical Pathology* 20:57-59
- Radostits OM, Done SH (2007) *Veterinary Medicine: A Textbook of the Diseases of Cattle, Sheep, Pigs, Goats, and Horses*. Elsevier Saunders
- Rainbolt S, Pillai DK, Lubbers BV, Moore M, Davis R, Amrine D, Mosier D (2016) Comparison of Mannheimia haemolytica isolates from an outbreak of bovine respiratory disease. *Vet Microbiol* 182:82-86
- Ramirez-Romero R, Brogden KA, Gallup JM, Dixon R, Ackermann MR (2000) Reduction of pulmonary mast cells in areas of acute inflammation in calves with Mannheimia (Pasteurella) haemolytica pneumonia. *Journal of comparative pathology* 123:29-35
- Rhoades KR, Rimler RB (1987) Capsular groups of Pasteurella multocida isolated from avian hosts. *Avian Dis* 31:895-898
- Rice JA, Carrasco-Medina L, Hodgins DC, Shewen PE (2007) Mannheimia haemolytica and bovine respiratory disease. In: *Animal Health Research Reviews, Book 8*, Cambridge, United Kingdom, Cambridge
- Rimler R, Brogden K (1986) Pasteurella multocida isolated from rabbits and swine: serologic types and toxin production. *American journal of veterinary research* 47:730-737

- Rimler RB, Rhoades KR (1987) Serogroup F, a new capsule serogroup of *Pasteurella multocida*. *Journal of Clinical Microbiology* 25:615-618
- Rimler RBG, J.R. (1997) Fowl Cholera. In: B.W. Calnek HJB, C.W. Beard, L.R. McDonald, Y.M. Saif (ed) *Diseases of Poultry*. Iowa State University Press, Mosby-Wolfe, Ames, London
- Rimler RBR, K. R. (1989) *Pasteurella multocida*. In: Adlam CR, J. M. (ed) *Pasteurella and pasteurellosis*. Academic Press, London; San Diego
- Rodger JL (1989) Parainfluenza 3 vaccination of sheep. *Vet Rec* 125:453-456
- Rosen MN (1975) Pasteurellosis (*P. multocida*). In: Hubbert WT, McCulloch WF, Schnurrenberger PR, Hull TG (eds) *Diseases transmitted from animals to man*. C. C. Thomas, Springfield, Ill.
- Rosenbusch CT, Merchant IA (1939) A Study of the Hemorrhagic Septicemia Pasteurellae. *J Bacteriol* 37:69-89
- Saadati M, Gibbs H, Parton R, Coote J (1997) Characterisation of the leukotoxin produced by different strains of *Pasteurella haemolytica*. *Journal of medical microbiology* 46:276-284
- Sánchez del Rey V, Fernández-Garayzábal JF, Domínguez L, Gottschalk M, Vela AI (2016) Screening of virulence-associated genes as a molecular typing method for characterization of *Streptococcus suis* isolates recovered from wild boars and pigs. *The Veterinary Journal* 209:108-112
- Sarangi LN, Thomas P, Gupta SK, Priyadarshini A, Kumar S, Nagaleekar VK, Kumar A, Singh VP (2015) Virulence gene profiling and antibiotic resistance pattern of Indian isolates of *Pasteurella multocida* of small ruminant origin. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 38:33-39

- Schierack P, Rödiger S, Kuhl C, Hiemann R, Roggenbuck D, Li G, Weinreich J, Berger E, Nolan LK, Nicholson B, Römer A, Frömmel U, Wieler LH, Schröder C (2013) Porcine *E. coli*: Virulence-Associated Genes, Resistance Genes and Adhesion and Probiotic Activity Tested by a New Screening Method. *PLOS ONE* 8:e59242
- Schulte PA, Perera FP (1993) *Molecular Epidemiology: Principles and Practices*. Academic Press
- Schwartz DC, Cantor CR (1984) Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* 37:67-75
- Selander RK, Caugant DA, Ochman H, Musser JM, Gilmour MN, Whittam TS (1986) Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl Environ Microbiol* 51:873-884
- Shayegh J, Atashpaz S, Hejazi M (2008) Virulence genes profile and typing of ovine *Pasteurella multocida*. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances* 3:206-213
- Shirzad Aski H, Tabatabaei M (2016) Occurrence of virulence-associated genes in *Pasteurella multocida* isolates obtained from different hosts. *Microbial Pathogenesis* 96:52-57
- Singh K, Ritchey JW, Confer AW (2011) *Mannheimia haemolytica*: bacterial-host interactions in bovine pneumonia. *Veterinary Pathology* 48:338-348
- Smith G (1960) The pathogenicity of *Pasteurella haemolytica* for young lambs. *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics* 70:326-338
- Smith GR (1961) The characteristics of two types of *Pasteurella haemolytica* associated with different pathological conditions in sheep. *The Journal of Pathology and Bacteriology* 81:431-440

- Smith GR, Philips JE (1990) *Pasteurella* and *Actinobacillus*. In: Parker MT, Duerden BI (eds) Topley and Wilson's principles of bacteriology, virology and immunology. B.C. Decker, Philadelphia, Pa.
- Sneath PH, Stevens M (1990) *Actinobacillus rossii* sp. nov., *Actinobacillus seminis* sp. nov., nom. rev., *Pasteurella bettii* sp. nov., *Pasteurella lymphangitidis* sp. nov., *Pasteurella mairi* sp. nov., and *Pasteurella trehalosi* sp. nov. Int J Syst Bacteriol 40:148-153
- Spratt BG (1999) Multilocus sequence typing: molecular typing of bacterial pathogens in an era of rapid DNA sequencing and the internet. Curr Opin Microbiol 2:312-316
- Stanton AL, Kelton DF, LeBlanc SJ, Millman ST, Wormuth J, Dingwell RT, Leslie KE (2010) The effect of treatment with long-acting antibiotic at postweaning movement on respiratory disease and on growth in commercial dairy calves. Journal of Dairy Science 93:574-581
- Struelens MJ (1998) Molecular epidemiologic typing systems of bacterial pathogens: current issues and perspectives. Mem Inst Oswaldo Cruz 93:581-585
- Subaaharan S, Blackall LL, Blackall PJ (2010) Development of a multi-locus sequence typing scheme for avian isolates of *Pasteurella multocida*. Veterinary Microbiology 141:354-361
- Suckow MA (2000) Immunization of rabbits against *Pasteurella multocida* using a commercial swine vaccine. Laboratory animals 34:403-408
- Suckow MA, Chrisp CE, Foged NT (1991) Heat-labile toxin-producing isolates of *Pasteurella multocida* from rabbits. Laboratory animal science 41:151-156
- Taneja N, Sangar G, Chowdhury G, Ramamurthy T, Mishra A, Singh M, Sharma M (2012) Molecular epidemiology of *Vibrio cholerae* causing outbreaks & sporadic cholera in northern India, Vol 136

- Tang X, Zhao Z, Hu J, Wu B, Cai X, He Q, Chen H (2009) Isolation, antimicrobial resistance, and virulence genes of *Pasteurella multocida* strains from swine in China. *J Clin Microbiol* 47:951-958
- Taylor JD, Fulton RW, Dabo SM, Lehenbauer TW, Confer AW (2010a) Comparison of Genotypic and Phenotypic Characterization Methods for *Pasteurella Multocida* Isolates from Fatal Cases of Bovine Respiratory Disease. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 22:366-375
- Taylor JD, Fulton RW, Lehenbauer TW, Step DL, Confer AW (2010b) The epidemiology of bovine respiratory disease: What is the evidence for predisposing factors? *The Canadian Veterinary Journal* 51:1095-1102
- Taylor JD, Fulton RW, Lehenbauer TW, Step DL, Confer AW (2010c) The epidemiology of bovine respiratory disease: What is the evidence for preventive measures? *The Canadian Veterinary Journal* 51:1351-1359
- Tefera G, Simola J (2001) *Pasteurella haemolytica* complex of *Pasteurella sensu stricto* as new genus *Mannheimia*: changes in taxonomy. *Veterinari Medicina - UZPI* Vol. 46: pp. 119-124
- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV (1997) How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. *Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America. Infect Control Hosp Epidemiol* 18:426-439
- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B (1995) Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Journal of Clinical Microbiology* 33:2233-2239
- Thonney M, C. Smith M, Mateescu R, Heuer C (2008) Vaccination of ewes and lambs against parainfluenza 3 to prevent lamb pneumonia, Vol 74

- Timsit E, Christensen H, Bareille N, Seegers H, Bisgaard M, Assié S (2013) Transmission dynamics of *Mannheimia haemolytica* in newly-received beef bulls at fattening operations. *Vet Microbiol* 161:295-304
- Townsend KM, Boyce JD, Chung JY, Frost AJ, Adler B (2001) Genetic Organization of *Pasteurella multocida* cap Loci and Development of a Multiplex Capsular PCR Typing System. *Journal of Clinical Microbiology* 39:924-929
- Townsend KM, Dawkins HJS, Papadimitriou JM (1997) Analysis of haemorrhagic septicaemia-causing isolates of *Pasteurella multocida* by ribotyping and field alternation gel electrophoresis (FAGE). *Veterinary Microbiology* 57:383-395
- Townsend KM, Frost AJ, Lee CW, Papadimitriou JM, Dawkins HJ (1998) Development of PCR assays for species- and type-specific identification of *Pasteurella multocida* isolates. *J Clin Microbiol* 36:1096-1100
- Townsend KM, Hanh TX, O'Boyle D, Wilkie I, Phan TT, Wijewardana TG, Trung NT, Frost AJ (2000) PCR detection and analysis of *Pasteurella multocida* from the tonsils of slaughtered pigs in Vietnam. *Veterinary Microbiology* 72:69-78
- Trevisan V (1887) Sul micrococco della rabbia e sulla possibilita di riconoscere durante il periodo d'incubazione, dall'esame del sangue della persona morsicata, se ha costratta l'infezione rabbica. In: *Rend R 1st Lomb Sci Let, Book 20*
- Vazquez JA, Berron S (2004) Multilocus sequence typing: the molecular marker of the Internet era. In: *Enferm Infecc Microbiol Clin, Book 22, Spain*
- Verma S, Sharma M, Katoch S, Verma L, Kumar S, Dogra V, Chahota R, Dhar P, Singh G (2013) Profiling of virulence associated genes of *Pasteurella multocida* isolated from cattle. *Vet Res Commun* 37:83-89
- Vílchez G, Alonso G (2009) Alcances y limitaciones de los métodos de epidemiología molecular basados en el análisis de ácidos nucleicos. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* 29:6-12

- Villard L, Gauthier D, Lacheretz A, Abadie G, Game Y, Maurin F, Richard Y, Borges E, Kodjo A (2006) Serological and molecular comparison of *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella trehalosi* strains isolated from wild and domestic ruminants in the French Alps. *The Veterinary Journal* 171:545-550
- Vougidou C, Sandalakis V, Psaroulaki A, Siarkou V, Petridou E, Ekateriniadou L (2015) Distribution of the ompA-types among ruminant and swine pneumonic strains of *Pasteurella multocida* exhibiting various cap-locus and toxA patterns. *Microbiological Research* 174:1-8
- Watson PJ, Davies RL (2002) Outbreak of *Pasteurella multocida* septicaemia in neonatal lambs. *Veterinary Record* 151:420-422
- Weiser GC, DeLong WJ, Paz JL, Shafii B, Price WJ, Ward AC (2003) Characterization of *Pasteurella multocida* associated with pneumonia in bighorn sheep. *Journal of Wildlife Diseases* 39:536-544
- Wilson BA, Ho M (2013) *Pasteurella multocida*: from zoonosis to cellular microbiology. *Clinical microbiology reviews* 26:631-655
- Wilson MA, Morgan MJ, Barger GE (1993) Comparison of DNA fingerprinting and serotyping for identification of avian *Pasteurella multocida* isolates. *J Clin Microbiol* 31:255-259
- Younan M, Fodar L (1995) Characterisation of a new *Pasteurella haemolytica* serotype (A17). *Res Vet Sci* 58:98
- Zecchinon L, Fett T, Desmecht D (2005) How *Mannheimia haemolytica* defeats host defence through a kiss of death mechanism. *Veterinary research* 36:133-156